ANNÉE SCOLAIRE 1971-1972 N° d'ordre : 629

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

par

Claude Françoise MOURIES

PHARMACIEN

Assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie et Hydrologie

Diplômée des Certificats d'Etudes Supérieures de

— Pharmacodynamie et Essais biologiques des médicaments
— Physiologie Animale
— Toxicologie et Hygiène Industrielle

née le 31 Mai 1943

à PORT-LYAUTEY (Maroc)

SUJET :

Etude de l'activité pharmacodynamique de quelques médicaments associés à l'alphachymotrypsine.

Présentée et soutenue publiquement le 25 Octobre 1971

devant la Commission d'Examen

MM. J. CANELLAS, Professeur ..... *Président*

R. BABIN, Professeur .....
J. ROQUEBERT, Professeur ..... } *Juges*
R. JENSEN, Maître de Conférences Agrégé

Association Amicale des Etudiants en Pharmacie
de Lyon

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543509_0015

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

par

Claude Françoise MOURIES

PHARMACIEN

Assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie et Hydrologie

Diplômée des Certificats d'Etudes Supérieures de
— Pharmacodynamie et Essais biologiques des médicaments
— Physiologie Animale
— Toxicologie et Hygiène Industrielle

née le 31 Mai 1943

à PORT-LYAUTEY (Maroc)

SUJET :

Etude de l'activité pharmacodynamique de quelques médicaments associés à l'alphachymotrypsine.

Présentée et soutenue publiquement le 25 Octobre 1971
devant la Commission d'Examen

MM. J. CANELLAS, Professeur ..... *Président*

R. BABIN, Professeur .....
J. ROQUEBERT, Professeur ..... *Juges*
R. JENSEN, Maître de Conférences Agrégé

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ANNEE SCOLAIRE
1971 - 1972

N° d'ordre : 629

THESE

présentée

A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX I I

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

par

Claude Françoise MOURIES

Pharmacien

Assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie et Hydrologie
Diplômée des Certificats d'Etudes Supérieures de
- Pharmacodynamie et Essais biologiques des médicaments
- Physiologie Animale
- Toxicologie et Hygiène Industrielle

née le 31 Mai 1943 à Port - Lyautey (Maroc).

Sujet : Etude de l'activité pharmacodynamique de quelques médicaments associés à l'alphachymotrypsine.

Présentée et soutenue publiquement le 25 Octobre 1971 devant la Commission d'Examen :

MM. J. CANELLAS, Professeur ..... Président
R. BABIN, Professeur .....
J. ROQUEBERT, Professeur ..... Juges
R. JENSEN, Maître de Conférences Agrégé...

" Nul n'est une île."

Tous ceux qu'il m'a été donné de rencontrer
savent ce que je leur dois.

Mes parents

dont l'indéfectible affection est mon soutien
le plus sûr.

Tous les Miens

Mes Amis

Mes Maîtres.

Monsieur le Professeur E. JOUZIER

Maître de Conférences Agrégé de Chimie Biologique.

Nous vous sommes très reconnaissante d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Monsieur le Docteur R. JENSEN

Maître de Conférences Agrégé de Chimie Biologique
Biologiste des Hôpitaux
Docteur ès Sciences
Chevalier des Palmes académiques

Vous nous avez fait bénéficier de votre riche expérience
Soyez assuré de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur J. ROQUEBERT

Professeur sans chaire de Pharmacodynamie

Vos conseils nous ont guidé très efficacement lors de la rédaction de notre travail. Nous vous en remercions très sincèrement.

Monsieur le Professeur R. BABIN

Professeur de Pharmacie chimique
Docteur ès Sciences
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier des Palmes Académiques

Vous nous avez fait l'honneur de sièger dans notre Jury de thèse.
Permettez-nous de vous adresser nos vifs remerciements.

Monsieur le Professeur J. CANELLAS

Professeur de Pharmacodynamie et d'Hydrologie
Officier des Palmes Académiques

Vous nous avez inspiré le sujet de ce travail et vous nous avez aidé dans sa réalisation avec beaucoup de bienveillance et de patience. Veuillez trouver ici l'assurance de notre sincère reconnaissance et de notre respectueuse affection.

Qu'il nous soit permis avant d'exposer notre travail de remercier ceux qui ont contribué à sa réalisation matérielle.

- Madame PERALES
  qui a toujours su apporter le plus grand soin à l'entretien de nos animaux et dont l'aide efficace, à plus d'un égard, nous a été d'un grand secours.

- Mesdames CARRERE, DUBIEF, LATAPIE et AVET
  Mesdemoiselles FLORENTIN et FOURNIER
  qui ont eu la lourde tâche de dactylographier notre manuscrit.

- Mademoiselle C. COUX et Madame D. SEGUIN
  qui nous ont amicalement prêté leur concours.

- Messieurs BOISSIER et IZZO
  qui ont grandement facilité nos recherches bibliographiques à la Bibliothèque.

ETUDE DE L'ACTIVITE PHARMACODYNAMIQUE

DE QUELQUES MEDICAMENTS ASSOCIES A L'ALPHACHYMOTRYPSINE.

§ §

§

INTRODUCTION.

L'utilisation des enzymes en thérapeutique est relativement ancienne puisque la prescription d'enzymes digestives dans les insuffisances gastro-intestinales remonte au XIX^{e} Siècle.

La nature un peu exceptionnelle des enzymes, ainsi que les difficultés de leur extraction ont longtemps limité leur emploi à la gastro-entérologie, mais depuis une vingtaine d'années les progrès de l'enzymologie et de la biologie moléculaire ont conduit à une extension parallèle de l'enzymothérapie.

Par une thérapeutique à base d'enzymes, on peut modifier l'intensité et la durée d'action d'un médicament.
En effet, l'intensité et la durée d'action d'un médicament sont fonction de son métabolisme au sein de l'organisme et ce métabolisme est lui-même régi par diverses enzymes.

D'une façon un peu arbitraire et schématique COURTOIS (24) a classé en quatre groupes les enzymes utilisées en pharmacie :

- les enzymes hautement purifiées comme les protéases pancréatiques (elles sont susceptibles d'être administrées éventuellement par injection).
- les enzymes à degré de purification moyen comme la pepsine et la papaïne.
- les préparations à degré de purification restreint où, le plus souvent, plusieurs enzymes distinctes sont associées. L'exemple le plus classique est la pancréatine avec ses diverses protéases, son amylase et sa lipase.
- les médicaments spécialisés où l'on introduit des enzymes de l'un des trois groupes précédents.

Les protéases d'origine pancréatique sont les enzymes les plus couramment utilisées en thérapeutique. Alors que l'alphachymotrypsine est administrée seule ou en association avec divers médicaments, la trypsine - du moins en France - n'est prescrite qu'en association.

Dans l'étude que nous avons entreprise, nous avons voulu, dans une première partie, faire le point des travaux antérieurs concernant surtout l'alphachymotrypsine, sa constitution, son activité et les usages qui en découlent, puis les propriétés de ses associations déjà connues.

Nous avons traité en parallèle, assez brièvement la constitution, l'activité et les usages de la trypsine pour souligner ses analogies et ses différences avec l'alphachymotrypsine.

Dans la deuxième partie consacrée à nos travaux personnels, nous avons étudié l'action d'associations mettant en oeuvre, in vivo puis in vitro, l'alphachymotrypsine et des médicaments connus tels que la phénylbutazone, la chlorphéniramine, le penthiobarbital, le pentobarbital, le méprobamate, le férulate de magnésium et le phénylhydroxypentane et, pour finir, l'acétylcholine, le chlorure de baryum et leurs antagonistes respectifs (ces derniers étant testés sur organe isolé).

PREMIERE PARTIE.

CHAPITRE I

NOTIONS FONDAMENTALES ET ACQUISITIONS RECENTES CONCERNANT LA BIOCHIMIE DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE (ET DE LA TRYPSINE).

C'est surtout vers l'alphachymotrypsine - et la trypsine dont les analogies avec l'alphachymotrypsine sont nombreuses - que se sont tournés les thérapeutes.

Avant d'aborder les applications cliniques auxquelles ces enzymes ont donné lieu, il nous a paru important de faire le point des connaissances actuelles relatives à ces deux protéases présentes dans les sécrétions exocrines du pancréas.

I) FORMATION DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE ET DE LA TRYPSINE.

Le pancréas est la glande qui secrète le plus d'enzymes dans l'organisme. Il déverse dans le duodénum un suc dont les propriétés sont connues depuis longtemps.

C'est en 1856 que Cl. BERNARD (12) découvre sa capacité de digérer l'albumine en attribuant à la bile un rôle dans cette protéolyse.

CORVISART, quelques années plus tard, montre que le suc pancréatique purifié, privé de bile, possède une forte activité protéolytique.

En 1867, KUHNE (53) désigne sous le nom de "trypsine" le principe actif du suc. Il observe que le tissu pancréatique frais ne possède aucune activité enzymatique, celle-ci n'apparaissant qu'après une macération de l'organe en milieu faiblement acide et à chaud.

Découvrant que ce phénomène ne se produisait pas en milieu fortement acide, HEIDENHAIN (42) conclut à une activation enzymatique de la trypsine. SCHEPALNIKOV confirme en 1899 les travaux de HEIDENHAIN par la découverte de l'entérokinase, enzyme qui active le suc pancréatique dans le duodénum en milieu neutre, légèrement acide ou alcalin.

Enfin, en 1935, un grand pas fut fait dans la connaissance des protéases pancréatiques par KUNITZ et NORTHROP (54)qui parvinrent à les obtenir sous forme cristalline.

La chymotrypsine et la trypsine existent dans la cellule pancréatique, la première à l'état de chymotrypsinogène et la seconde à l'état de trypsinogène , tous deux enzymatiquement inactifs : elles sont sous forme de pro-enzyme.

C'est ainsi que ces protéases peuvent être synthétisées et stockées dans un milieu protéique sans le digérer.

Normalement, ces enzymes ne sont activées qu'en dehors du pancréas. Dans certains cas pathologiques (au cours de la pancréatite par exemple) leur activation est intra-pancréatique et les enzymes libérées digèrent la glande qui les a synthétisées.

Ces pro-enzymes sont des protéines complexes présentant une structure primaire constituée par une chaîne d'acides aminés, une structure secondaire résultant de l'enroulement des chaînes d'amino-acides, et une structure tertiaire indiquant la disposition de la chaîne dans l'espace et son hydratation (71 - DE ROECK - HOLTZAUER Y. et coll.).

L'enchaînement séquentiel des acides aminés joue un rôle primordial et se trouve génétiquement fixé.
Le repliement des chaînes - dont la disposition les unes par rapport aux autres est bien définie - favorise l'établissement des ponts disulfure comme nous le verrons plus loin.

Alors qu'il n'existe qu'une seule forme de trypsinogène et de trypsine, on connait toute une famille de chymotrypsines issues d'un ou plusieurs chymotrypsinogènes.

A) LES CHYMOTRYPSINOGENES DE BOEUF ET LEURS PRODUITS D'ACTIVATION.

Elaborés dans les cellules acineuses du pancréas, ce sont surtout les chymotrypsinogènes de boeuf qui ont été étudiés.

Le pancréas bovin renferme les chymotrypsinogènes A et B. Le premier étant le plus facilement cristallisé est le mieux connu.

Contrairement à ce que l'on pensait, les proportions de ces deux pro-enzymes ne sont pas identiques. Alors que la forme A représente 15 p.100 des protéines totales de suc pancréatique bovin, la variété B n'en présente que 4 p.100 (21- CHARLES M.) Mais chacun d'eux est redevable d'environ 16 p.100 de l'activité protéolytique totale de la sécrétion pancréatique bovine. (23 - COLMAN R.W.).

1°) Structure et activation du chymotrypsinogène A

Cette molécule se présente comme une chaîne polypeptidique simple de 246 amino-acides dont le poids moléculaire est de 25.000 et dont la séquence est presque totalement élucidée (26 - DESNUELLE P.).

Les amino-acides N et C terminaux sont respectivement la cystéine (position 1) et l'asparagine (position 246). Cinq ponts disulfure relient les résidus cystéine de la chaîne. Leur emplacement varie un peu avec les auteurs comme le montre le tableau 1.

pont disulfure n°	Position des ponts soufrés	
	HARTLEY	KEIL
1	1 - 122	1 - 119
2	42 - 58	42 - 58
3	136 - 201	133 - 198
4	168 - 182	165 - 179
5	191 - 221	188 - 216

Tableau 1 - Position des ponts soufrés dans le chymotrypsinogène A de boeuf selon HARTLEY (40) et KEIL (50).

KRAUT J.(52) et BLOW D.M. (14 et 15) utilisant la diffraction des rayons X ont donné les premières indications sur la structure tertiaire de la molécule : il s'agit d'une ellipsoïde renfermant relativement peu d'hélices α en comparaison de l'hémoglobine ou de la myoglobine.

L'activation du chymotrypsinogène A en chymotrypsine se fait par plusieurs protéolyses limitées où interviennent la trypsine et la chymotrypsine elle même qui joue dans cette réaction le rôle de substrat et d'enzyme.

Les étapes de cette transformation sont schématisées dans la figure 1.

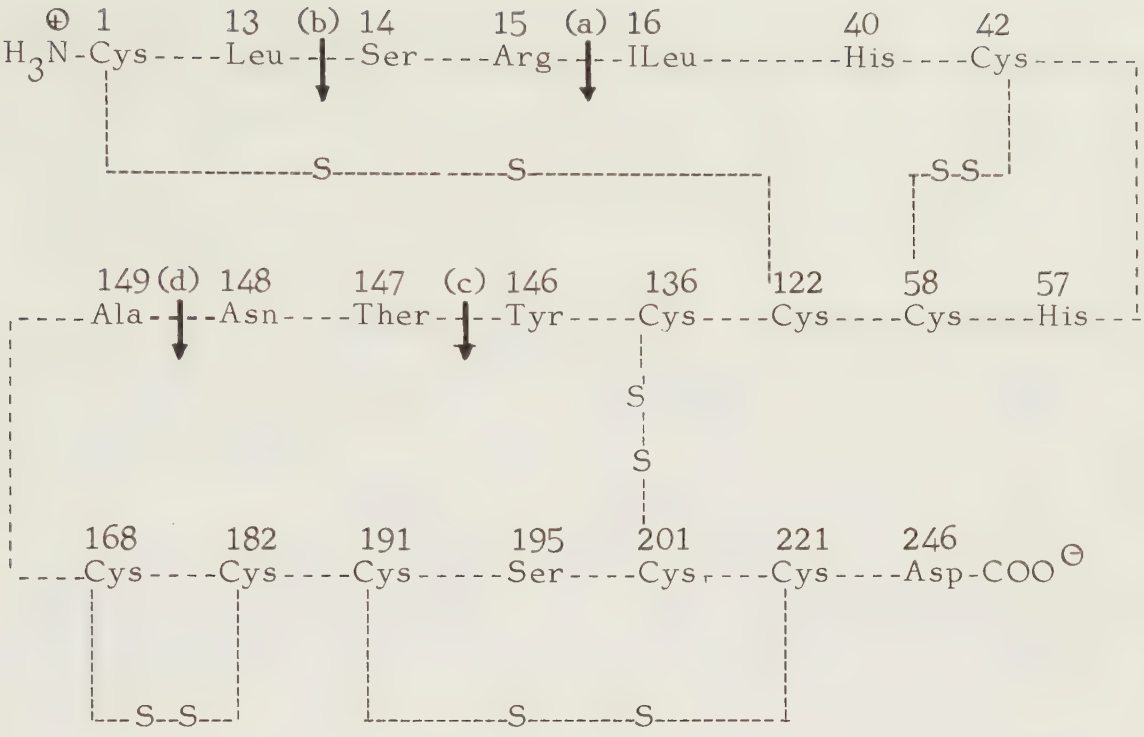


Figure 1 : Activation du chymotrypsinogène A de boeuf selon DESNUELLE (26) et HARTLEY (40).
Les pointillés représentent les résidus non inscrits.

La trypsine rompt la liaison peptidique entre l'arginine 15 et l'iso-leucine 16 pour donner la π - chymotrypsine pleinement active (a) , la suite du phénomène dépend alors des conditions de l'activation :

Si les quantités de trypsine sont élevées, la transformation est du " type rapide " et la π - chymotrypsine donne la δ - chymotrypsine par autolyse de la liaison entre la leucine 13 et la sérine 14 (b) avec libération de séryl-arginine.

Par contre, en présence de faibles quantités de trypsine l'activation est du "type lent". Une partie du chymotrypsinogène est alors attaquée par sa propre chymotrypsine au niveau des liaisons entre la tyrosine 146 et la thréonine 147 d'une part (c) et entre l'asparagine 148 et l'alanine 149 d'autre part (d) avec mise en liberté d'un autre dipeptide : la thréonyl-asparagine et formation de néo-chymotrypsinogènes inactifs mais encore activables. (75 - ROVERY M. et coll.).

Leur transformation par la trypsine engendre d'autres chymotrypsines "lentes" dont la plus connue est la forme α un peu moins active que les variétés π et δ "rapides" (46 - INAGAMI T. et coll.).

D'ailleurs, des auteurs ont montré que l'alpha - chymotrypsine trois fois cristallisée est hétérogène à l'électrophorèse (34 - ERLANGER B.F.). Elle renferme à la fois des chymotrypsines " rapides" et plusieurs chymotrypsines lentes du type α .

Si l' α - chymotrypsine cristallisée est mise en solution puis conservée trois semaines au froid, elle se transforme en une nouvelle forme cristalline appelée γ - chymotrypsine.

Si cette solution est alors remise quelques jours à la température ordinaire, on obtient une forme appelée β -chymotrypsine (56 - LASKOWSKI M.).

On ignore le mécanisme de ces transformations. Les nouvelles espèces moléculaires peuvent être considérées comme des variétés allomorphiques de l'alphachymotrypsine.

Le seul chymotrypsinogène A de boeuf peut donc donner naissance à toute une série de chymotrypsines plus ou moins actives appelées π , δ , α , β , γ - chymotrypsine.
Les diverses étapes de cette activation sont résumées dans la figure 2.

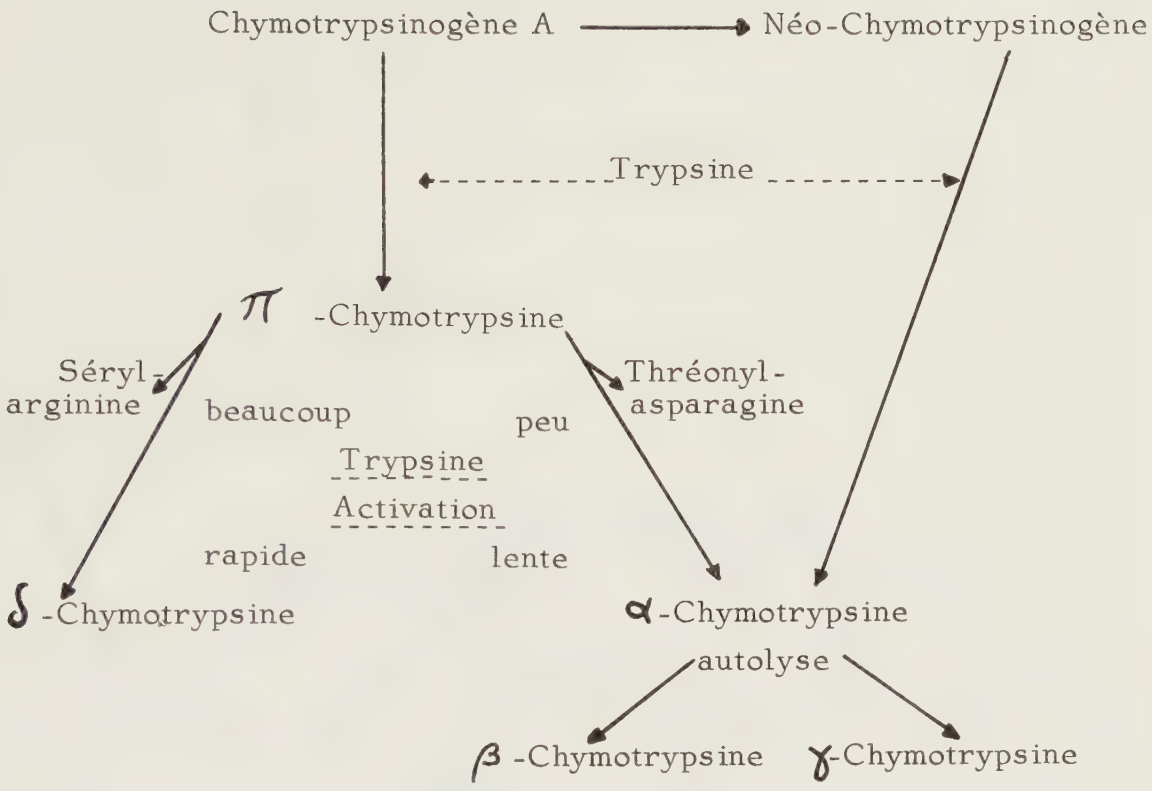


Figure 2 : Activation du chymotrypsinogène A selon DIXON M. et WEBB E. (29).

La figure 3 à laquelle nous nous référerons à plusieurs reprises ultérieurement, nous permet de concrétiser les notions de structure et d'activation du chymotrypsinogène A de boeuf.

Elle n'est en aucune manière la projection sur un plan de la forme des molécules. Elle souligne simplement la configuration des chaînons afin que les restes de cystéine soient à une distance compatible avec l'établissement d'un pont disulfure.

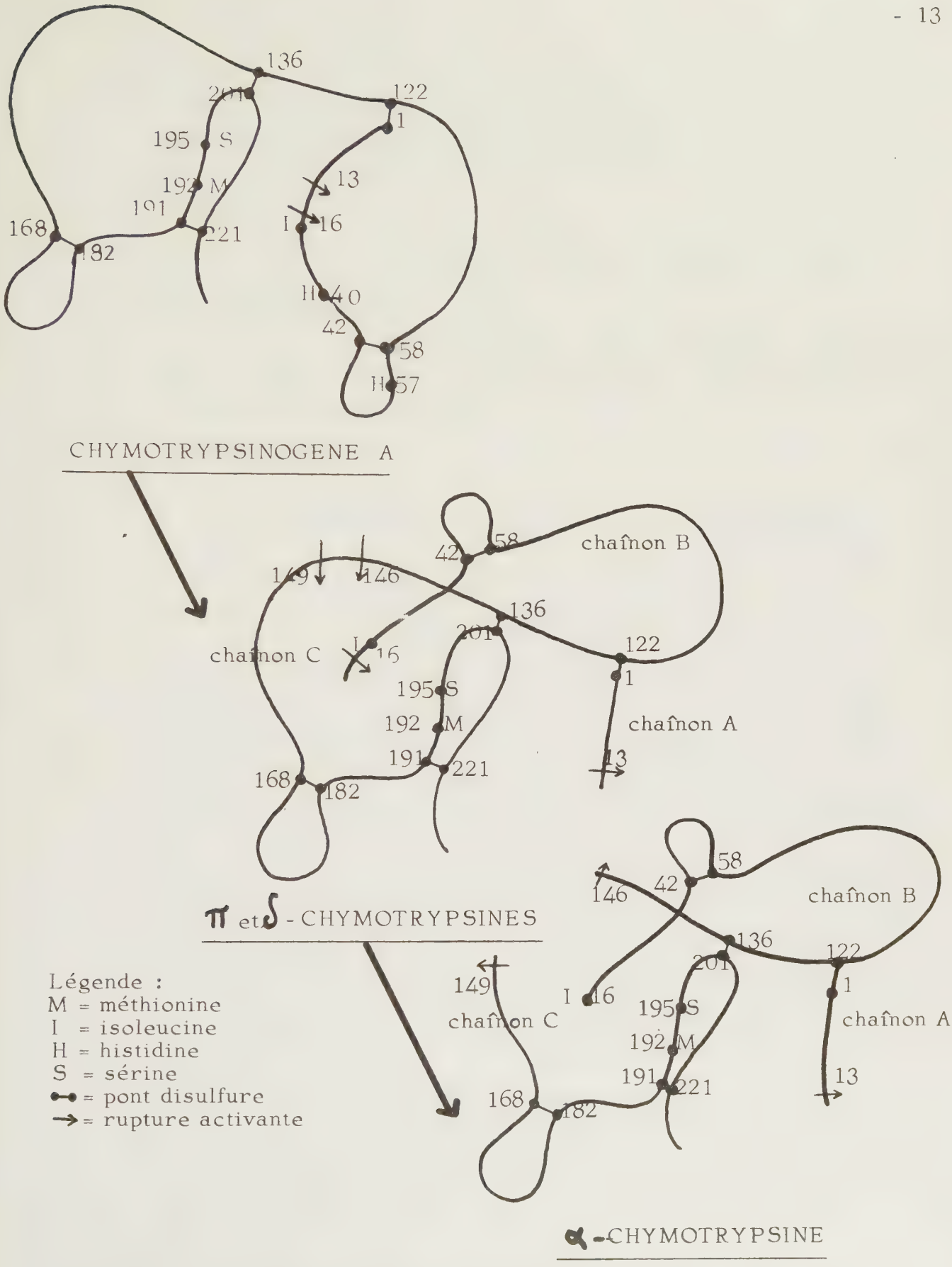


Figure 3 : Activation du chymotrypsinogène A de boeuf. (15 - BIETH J.)

On ignore l'origine de la spécificité de rupture de la liaison 15 - 16 par la trypsine. On pense que la structure tertiaire de la molécule de chymotrypsinogène confère à cette liaison une position particulièrement favorable à l'hydrolyse trypsique.

D'autre part, on sait que cette rupture modifie le pouvoir rotatoire de la molécule et donc sa structure tertiaire (67 - PECHERE J.F. et coll.).

Ce ré-arrangement intra-moléculaire sensibilise alors la π - chymotrypsine à l'action de la chymotrypsine et favorise donc sa dégradation.

2°) Structure et activation du chymotrypsinogène B.

A côté du chymotrypsinogène A, le pancréas bovin secrète aussi une forme B de ce précurseur.

La composition en amino-acides de ces deux molécules varie peu (elles possèdent par exemple 2 résidus histidine et les mêmes amino-acides N et C terminaux), mais, du fait de la proportion variable en résidus basiques des chymotrypsinogènes A et B de boeuf, leur point iso-électrique est différent (9,3 pour A et 5,2 pour B) ainsi que leur spécificité (33 - ENENKEL A.G. et coll.).

Le chymotrypsinogène B de boeuf ne possède que 4 liaisons soufrées mais son activation est semblable : la trypsine rompt la liaison 15 - 16 entre l'arginine et l'iso-leucine.

Néanmoins la π - chymotrypsine formée n'est plus dégradée ultérieurement et on sait maintenant que le chymotrypsinogène B de boeuf n'engendre qu'une seule chymotrypsine appelée B.

Les chaînons A (figure 3) de l' α - chymotrypsine et de la B - chymotrypsine ne diffèrent entre eux que par un seul résidu : leur filiation génétique parait donc certaine (74 - ROVERY M.).

B) LE TRYPSINOGENE DE BOEUF ET SON ACTIVATION.

Dans le pancréas du boeuf, on ne trouve qu'une seule sorte de trypsinogène. L'étude de sa structure et de son activation a été menée parallèlement à celle du chymotrypsinogène.

Le trypsinogène de boeuf est constitué par une chaîne polypeptidique de 228 amino-acides (74 - ROVERY M.) dont la séquence n'est pas totalement élucidée. Sa masse moléculaire est voisine de 24.000 (69 - PERLES R. et coll.).

Il renferme 6 ponts disulfure (correspondant à 12 restes de cystéine). On ne connait avec exactitude que l'emplacement de deux d'entre eux.

Les résidus N et C terminaux sont respectivement la valine et l'asparagine (figure 4).

L'activation du trypsinogène peut se faire de plusieurs manières. Elle a pu s'observer d'abord en laissant macérer le pancréas plusieurs heures à pH 4,5. Dans l'intestin grêle, l'entérokinase en présence de Ca^{++} permet l'activation qui est maximale à pH 8 et à 37°C. . L'activation peut être également autocatalytique (27 - DESNUELLE P. et coll.).

Tous ces mécanismes impliquent une rupture au niveau de la liaison lysine – iso-leucine entre le 6° et le 7° acide aminé de la séquence N terminale du trypsinogène.
Il en résulte la libération d'un hexapeptide à partir de l'extrémité N terminale.

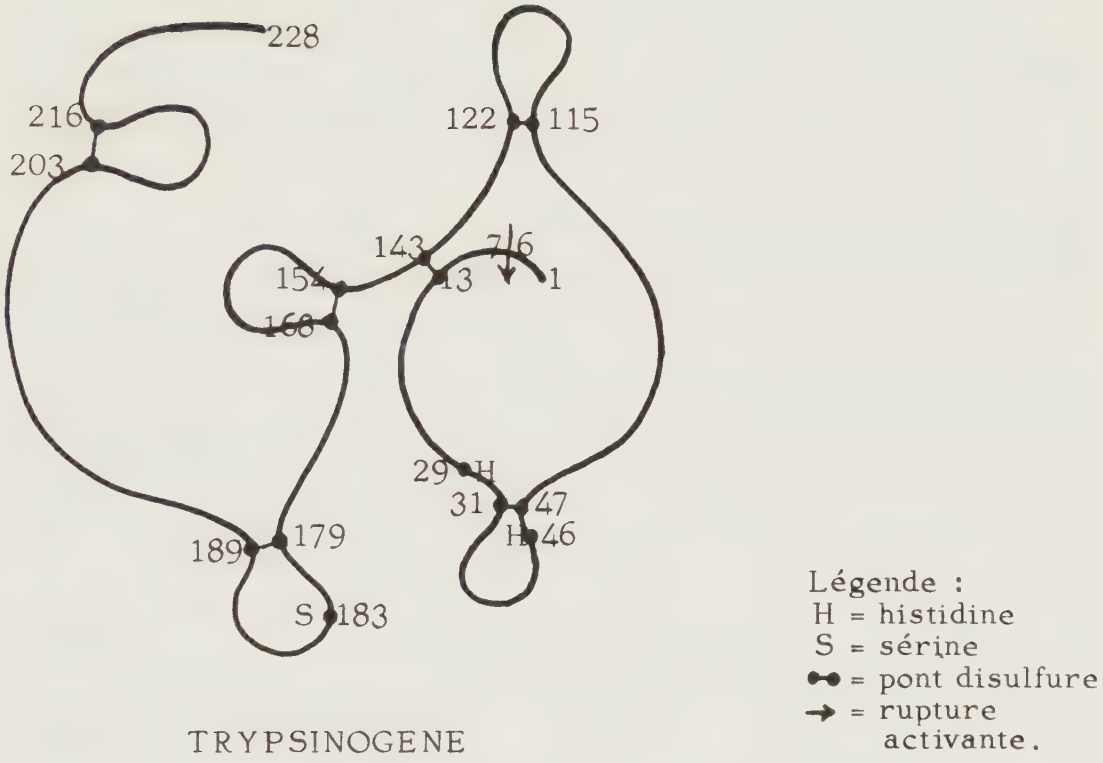


Figure 4 : Activation du trypsinogène de boeuf. (13 - BIETH J.)

II) STRUCTURE ET MECANISME D'ACTION DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE ET DE LA TRYPSINE.

A) STRUCTURE DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE.

La plus connue des chymotrypsines obtenues par activation du chymotrypsinogène A est l'alphachymotrypsine.

Pour la première fois, KUNITZ parvint en 1935 à l'obtenir sous forme de cristaux. C'est grâce à la stabilité de cette forme, et à la constance de son action que son usage thérapeutique a pu se répandre (23 - COLMAN R.W.).

Deux dipeptides ayant été libérés au cours de l'activation du chymotrypsinogène A, l'enzyme formée ne possède donc plus que 242 acides aminés.

Au sein de cet édifice complexe, il existe une partie bien précise de la molécule qui sera le siège de la réaction enzymatique : c'est le site actif. Et c'est précisément à ce niveau que, temporairement, va se fixer le substrat.

Tout site actif possède deux caractéristiques essentielles :

- il ne comporte qu'un très petit nombre d'acides aminés dits de "contact" car ils assurent les liaisons avec le substrat dont ils sont distants au maximum de 2 Å.

- il est situé dans la zone hydrophobe interne de la molécule c'est à dire en milieu non aqueux, donc dans un environnement où les échanges électroniques entre la protéine enzymatique et le substrat se réalisent facilement.

Selon la théorie de TURNBULL, pour que l'enzyme puisse agir sur le substrat, il faut que ce dernier soit convenablement disposé dans l'espace du site actif.

Une mise en place coordonnée est réalisée par 3 chaînons d'acides aminés. Chacun d'eux joue vis à vis du substrat un rôle particulier et défini : l'un assure la liaison, l'autre l'orientation dans l'espace, et le troisième réalise l'activation proprement dite.

Le chymotrypsinogène A a été coupé en 2 points lors de son activation. L'alphachymotrypsine possédera donc trois chaînes appelées A, B et C (figure 3).

Le chaînon A ne renferme que 13 résidus (dont la séquence est connue). Il est porteur de la cystéine N terminale et se trouve relié à la chaîne B par le pont soufré 1 - 122, tandis que les chaînons B et C sont reliés entre eux par le pont 136 -20.

Les ponts disulfure 42 - 58 d'une part, et 168 - 182 et 191 - 221 d'autre part se trouvent respectivement dans les chaînons B et C. Ces trois chaînons ont pu être individualisés par chromatographie après oxydation des liaisons soufrées.

Le chaînon B contient environ 130 amino-acides (dont deux résidus histidine du centre actif).

Le chaînon C est le plus difficile à étudier. Son dérivé S- sulfonique, digéré par la trypsine donne des peptides solubles et un fragment insoluble. La séquence des amino-acides des peptides solubles est connue tandis que celle du fragment insoluble n'est pas encore totalement élucidée (28 - DINH VAN HOANG et coll.).
Ce chaînon se compose d'environ 100 résidus. Il est dépourvu d'histidine et renferme un reste de sérine constitutif du centre actif.

Le site actif de l'alphachymotrypsine est constitué par 3 acides aminés (sur plus de 200 !) : 2 histidine et 1 sérine, ce qui vaut à cette enzyme d'être rattachée au groupe des " sérines protéases".

L'inhibition de la chymotrypsine par des substances diverses a permis d'en connaitre le site actif.

C'est ainsi que les organosphosphorés inhibent les actions protéolytiques et estérolytiques de la chymotrypsine et par combinaison avec l'enzyme donnent un complexe inactif. Avec le D. F.P. (di-isopropylfluorophosphate) la réaction est stoéchiométrique : 1 mole de D.F.P. se combine avec 1 mole de chymotrypsine (5 - BALLS A.K. et coll.) .

Dans ce complexe, on a pu montrer que le groupement acide libre de l'acide phosphorique était estérifié par la fonction alcoolique d'un résidu sérine. Des travaux récents ont permis de voir qu'il s'agissait de la sérine 195 se trouvant dans le chaînon C de l'alphachymotrypsine.

Ce résultat est confirmé par le fait que la transformation de cette sérine en déhydro-alanine (seul l'hydroxyle manque) abolit complètement l'activité de la chymotrypsine (87 - STRUMEYER D.H. et coll.).

La sérine appartient à une séquence ASP- SER - GLY - et se trouve à proximité d'un pont disulfure reliant les résidus cystéine 191 et 221.

Un autre inhibiteur, le T.K.C.P. (tosylamido-2 - phényléthyl- chlorméthyl -cétone) ne réagit pas avec la sérine mais bloque des résidus histidine.
(65 - NEURATH H. ; 79 - SCHOELLMAN G. et coll.) .
Grâce au T.K.C.P., on a pu montrer que deux résidus histidine participent au site actif de la chymotrypsine. Ils ont été identifiés dans le chaînon B et occupent les positions 40 et 57 (ils sont donc séparés par 16 acides aminés). Ils interviennent dans l'activité hydrolysante par un apport d'électrons fournis par le noyau imidazol.

Les molécules d'histidine, tout comme la sérine, sont assez voisines des molécules de çystéine reliées par des ponts disulfure qui obligent la molécule à constituer une boucle. Il en résulte un rapprochement des résidus histidine qui voisinent ainsi dans l'espace alors qu'ils seraient éloignés si la chaîne était linéaire. On peut ainsi imaginer la configuration spatiale vraisemblable de la molécule (figure 3).

B) STRUCTURE DE LA TRYPSINE

Tout comme la chymotrypsine, le centre actif de la trypsine est constitué par une molécule de sérine et deux molécules d'histidine.

La sérine se trouve en position 183, elle appartient à une séquence ASP - SER - GLY et se trouve à proximité d'un pont disulfure reliant les résidus cystéine 179 et 189.

Ici encore, les deux résidus histidine situés en position 29 et 46 sont séparés par 16 acides aminés. Ils sont, eux aussi, assez voisins des molécules de cystéine reliées par des ponts disulfure qui obligent la molécule à constituer une boucle.

Comme pour l'alphachymotrypsine, ceci a pour effet d'amener les résidus histidine à voisiner dans l'espace alors qu'ils seraient éloignés si la chaîne était linéaire.

C) COMPARAISON ENTRE LA STRUCTURE DE L'ALPHA-CHYMOTRYPSINE ET LA STRUCTURE DE LA TRYPSINE.

Nous venons de voir que la masse moléculaire de ces deux enzymes et le nombre des amino-acides qui les composent sont très voisins.

Nous savons également qu'elles possèdent les mêmes sites actifs principaux constitués par un résidu sérine et deux résidus histidine.

En outre ces deux protéases sont des espèces moléculaires très voisines. En effet , si l'on superpose leurs chaînes peptidiques, un simple déplacement latéral suffit pour faire coïncider environ 40 p. 100 des acides aminés dans des proportions identiques, en particulier dans les régions du site actif.

Il n'est que d'observer la position des résidus cystéïne pour comprendre que les "boucles " formées par les liaisons soufrées confèrent à ces deux enzymes une structure secondaire très voisine.

La figure 5 montre les positions respectives des différents amino-acides d'après les séquences établies par HARTLEY B.S. (41) et HOFMAN T. (44).

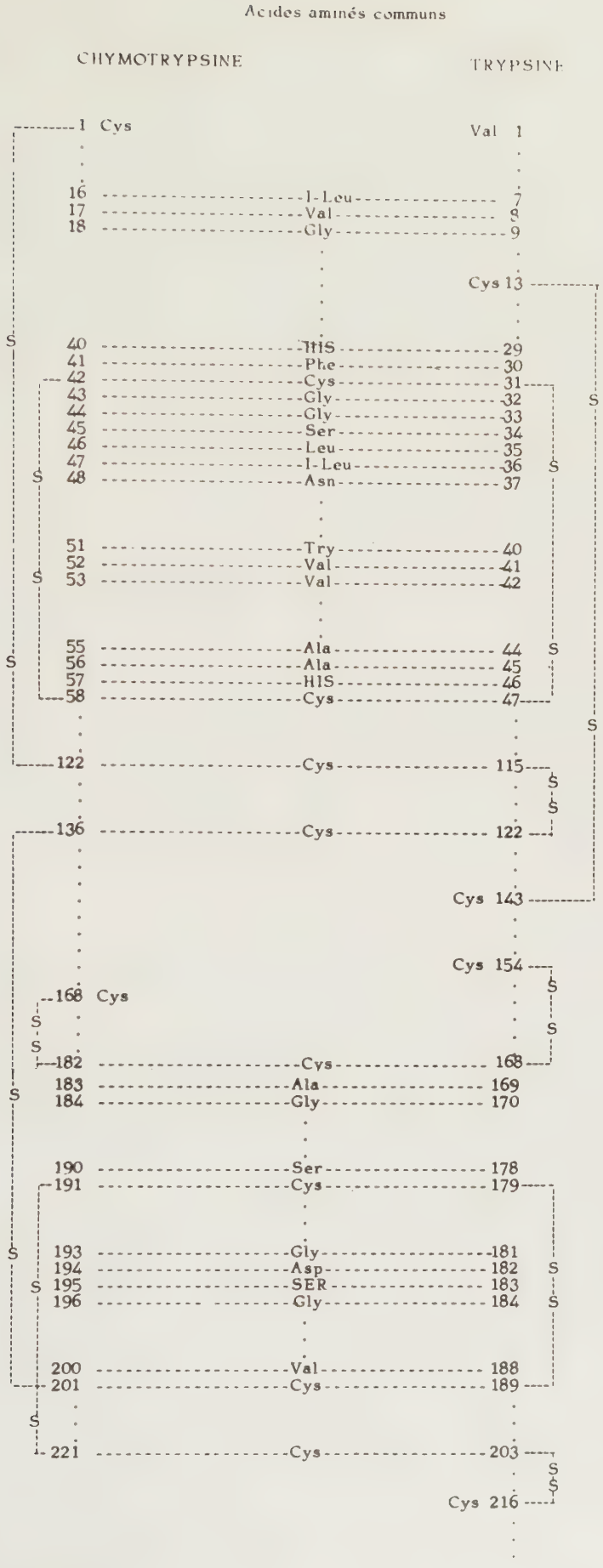


Figure 5 : Comparaison structurale entre la chymotrypsine et la trypsine.

On remarquera que les résidus histidine sont engagés dans une " boucle " de la chaîne formée grâce à un pont soufré et que les restes sérine sont, dans les deux cas, situés entre deux cystéine contigües liées à d'autres cystéine de la chaîne par des ponts soufrés. Cette position particulière aurait peut-être pour conséquence d'exalter leur activité.

De plus, lors de leur activation, les deux pro-enzymes sont attaquées à proximité de la séquence commune I-leu — Val — Gly. Cette séquence peut donc être considérée comme indispensable à l'"exposition" de la liaison en vue de son hydrolyse.

En outre les résidus cystéïne formant les liaisons soufrées sont entourés de quelques amino-acides semblables dans les deux cas. On peut donc penser que la structure secondaire des deux molécules est très voisine.

Ces parentés structurales s'accompagnent aussi de propriétés catalytiques communes.

En effet, comme nous le verrons plus loin, le mécanisme de l'acylation caractérise le processus hydrolytique des deux enzymes. Et pourtant chacune d'entre elles garde sa spécificité envers certains substrats.

Quel est donc le support de cette spécificité ? La réponse réside sans doute dans la configuration de la structure tertiaire de ces protéases. En effet, elle conditionne les propriétés macro-moléculaires permettant à une enzyme d'orienter ses sites actifs en vue de l'hydrolyse d'un substrat si ce dernier possède des groupements aptes à induire un changement spécifique de sa configuration spatiale.

D) MECANISME D'ACTION DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE ET DE LA TRYPSINE

Ces enzymes hydrolysent les protéines au niveau des liaisons peptidiques - CO —NH - situées à l'intérieur des molécules : ce sont des endopeptidases.

Elles appartiennent à la catégorie des Peptidyl-peptide-hydrolases (3 - 4 - 4) définie par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie.

Celle-ci a attribué respectivement le rang 5 à l'alphachymotrypsine (3 - 4 - 4 - 5) qui hydrolyse les peptides, les amides, les esters etc ... spécialement au niveau des liaisons engageant les groupes carboxyl des L-amino-acides aromatiques tels la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane (et dans une certaine mesure la leucine, la méthionine, la glutamine, et l'asparagine).

Elle a attribué le rang 4 à la trypsine (3 - 4 - 4- 4) dont l'action porte aussi sur les peptides, les amides, les esters, etc .... mais au niveau des liaisons engageant les groupes carboxyl de la L - arginine ou de la L- lysine (27 - DESNUELLE P.).

Comme l'ont montré récemment divers auteurs (DOHERTY et THOMAS, CALVET et coll. cités par VALDECASAS) ces deux molécules sont capables de scinder des liaisons carbone-carbone (action desmolasique) (84 - SHAPIRO R. et coll.; 89 - VALDECASAS F.G.).

La chymotrypsine possède en outre une action d'exopeptidase (les exopeptidases attaquent les liaisons peptidiques en bout de chaîne) avec un caractère d'amino-peptidase (les amino-peptidases attaquent les liaisons peptidiques voisines d'un – CH – porteur d'une fonction NH_2 libre) et arrive à dissocier les liens stériques (CALVET et CAROL cités par VALDECASAS) tandis que la trypsine parvient à rompre des peptides cycliques (27 - DESNUELLE P.) .

La chymotrypsine possède donc dans son ensemble un spectre d'action plus large que celui de la trypsine. Le pH le plus favorable à son activité se situe entre 7 et 9.

Le mécanisme d'action de l'alphachymotrypsine a été étudié par HARTLEY B.S. (40).

Il se déroule en trois étapes principales : tout d'abord la liaison enzyme -substrat, puis l'acylation de la sérine avec rupture du substrat, et enfin la désacylation qui conduit à la régénération de l'enzyme.

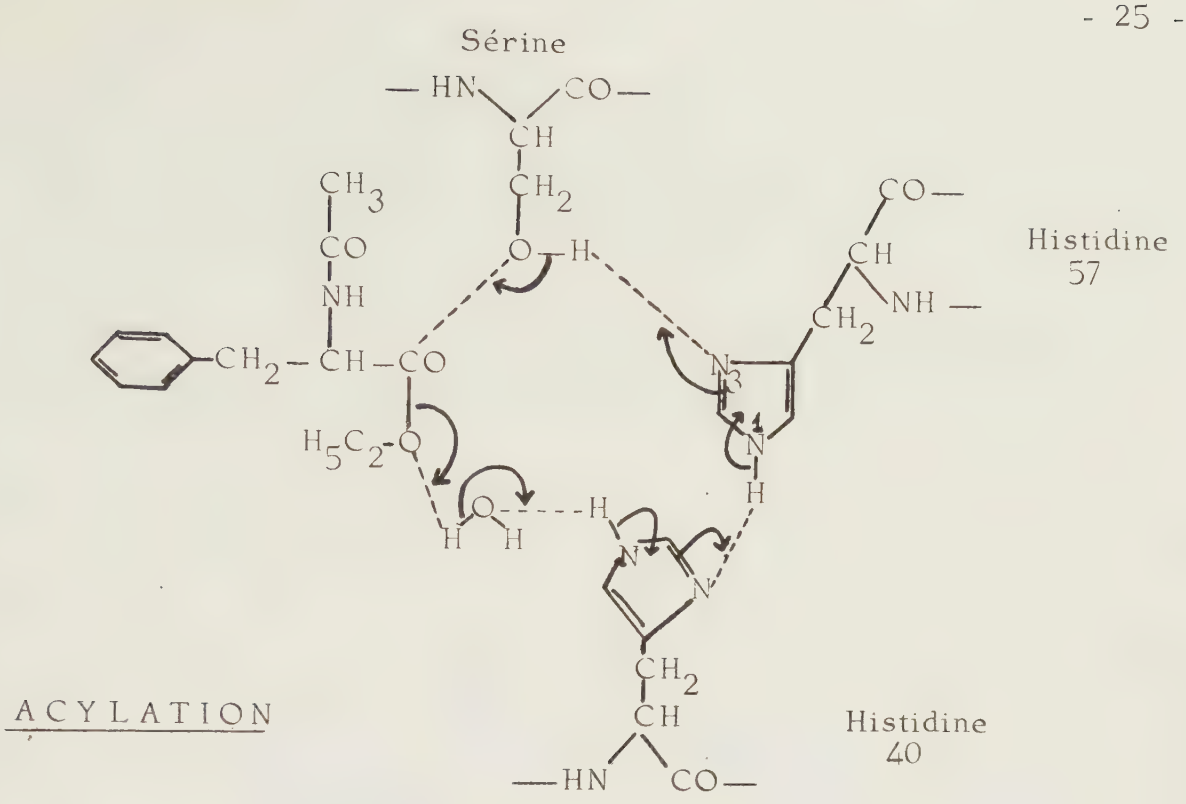
Cette acylation-désacylation nécessite la participation de deux groupements imidazoliques : les résidus histidine 40 et 57 dont les N participent à ces mécanismes
(79 - SCHOELLMANN G. et coll.).

HARTLEY B.S. (40) propose un schéma d'action de la chymotrypsine sur l'acétyl-phényl-alanine-éthyl-ester faisant intervenir la sérine 195 et les résidus histidine 40 et 57 (figure 6).

Après la combinaison enzyme -substrat, il y a formation de divers ponts hydrogène reliant étroitement le substrat au site actif de l'enzyme.

Le pont entre l'histidine 57 (par N en 3) et la sérine favorise l'attaque au niveau du carboxyle du substrat, tandis que les électrons sont transférés à une molécule d'eau activée par le deuxième noyau imidazolique.

Dans la désacylation, cette molécule d'eau hydrolyse la liaison acyl-sérine.



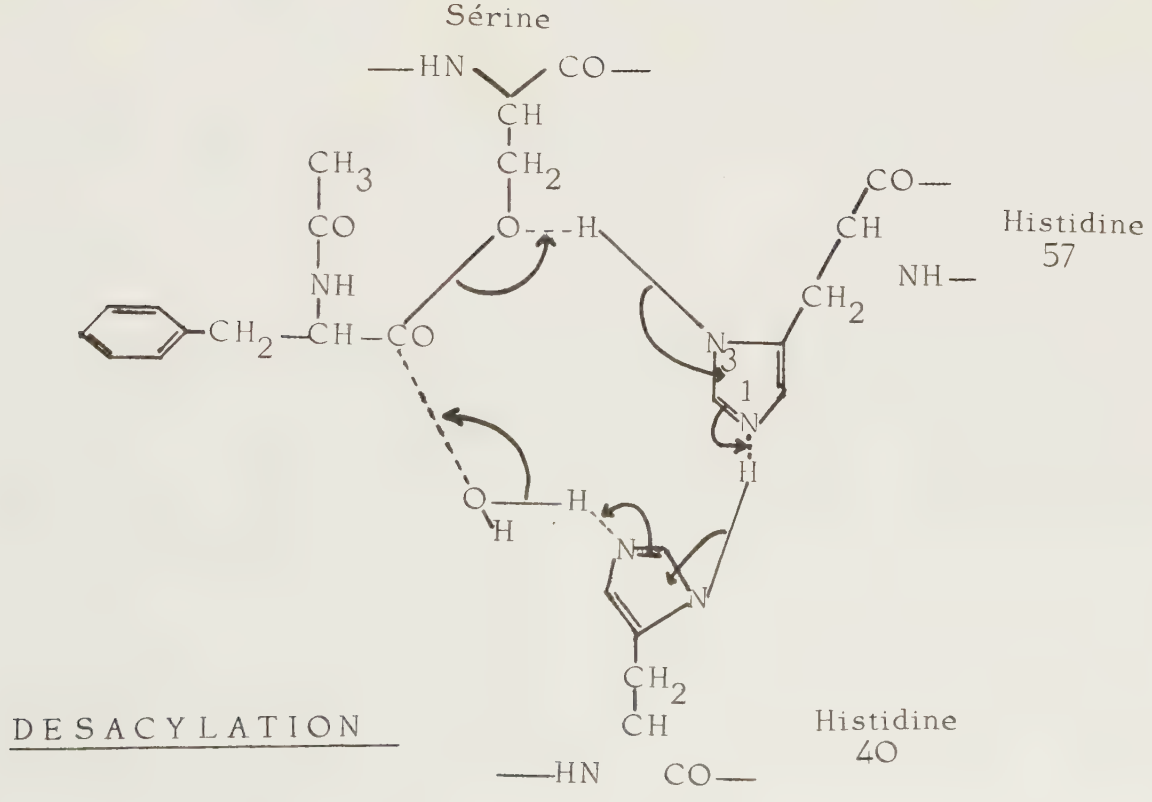


Figure 6 : Mécanisme d'action de la chymotrypsine selon HARTLEY (40).

Selon BLOW D.M. et coll. (15) , le résidu Asp 102 participe à la réaction d'hydrolyse. Dans l'enzyme native, sa chaîne latérale est reliée à l'azote 1 de l'histidine 57 tandis que l'azote 3 est relié à la SER 195.

La figure 7 montre la disposition de quelques acides aminés du centre actif de l'alphachymotrypsine.

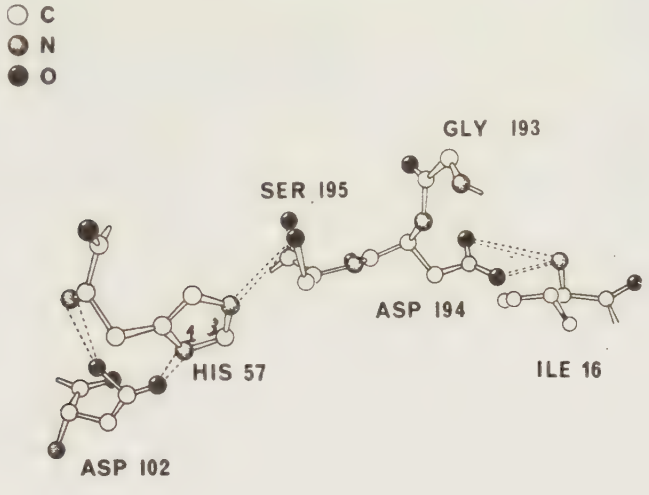
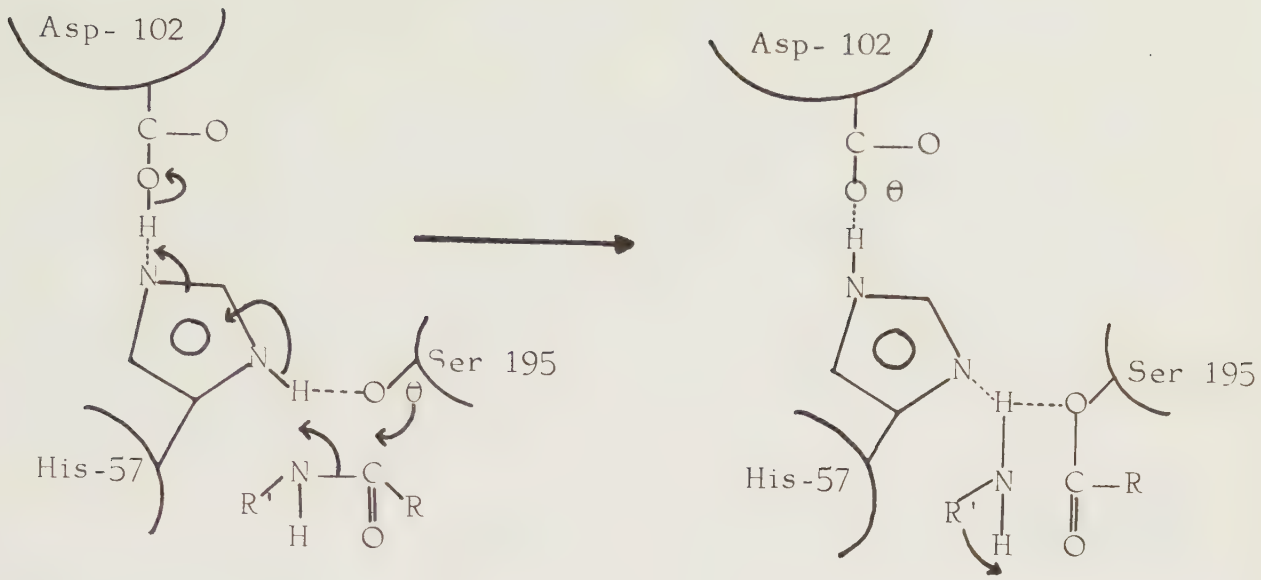


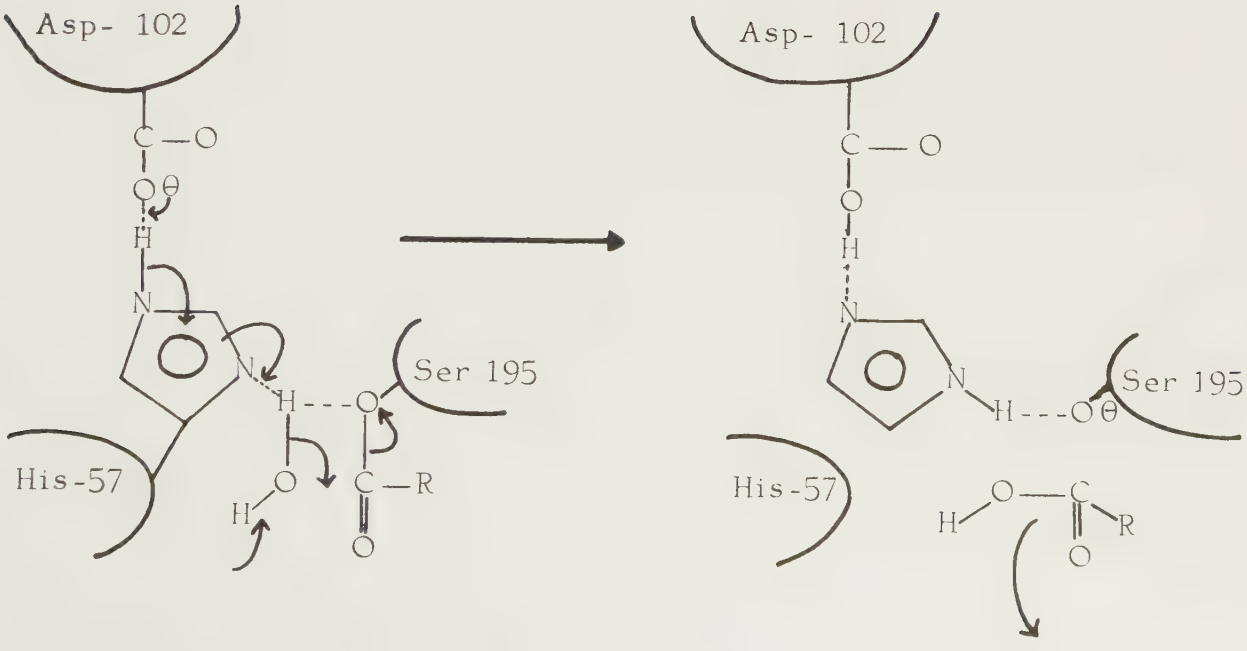
Figure 7 : Site actif de l'alphachymotrypsine selon BLOW D.M. et coll. (15).

Le transfert d'électrons à travers les liaisons hydrogène et la chaîne polarisable imidazole s'établit ainsi entre Asp 102 à la surface de la molécule et Ser 195. Ce sytème de liaison hydrogène qui porte le nom de "charge relay system" - système libérateur de charge - rend compte d'une augmentation du transfert des protons de Ser 195 et His 57.

La figure 8 nous montre le schéma que BLOW D.M et coll. proposent pour expliquer le mécanisme d'action de l'alphachymotrypsine sur une liaison peptidique.



ACYLATION



DESACYLATION

La liaison avec le substrat induit une adaptation de l'enzyme qui amène ses groupements actifs dans une position favorable.

Ce changement de structure s'accompagne d'un changement d'ionisation des trois amino-acides du site actif : les résidus d'histidine 40 et 57 et l'iso-leucine N terminale du chaînon B (55 - LABOUESSE B. et coll.). Le rôle de cet amino-acide serait de maintenir la conformation du centre actif de la chymotrypsine. C'est lui qui contrôlerait la mise en place des sites actifs de la molécule quand l'enzyme se lie au substrat.

La spécificité de la chymotrypsine envers certains substrats se manifeste en général dans l'étape d'acylation mais aussi parfois dans la désacylation.

La désacylation serait favorisée par la liaison d'une partie adéquate du substrat avec un autre site spécifique de l'enzyme : d'autres amino-acides seraient donc engagés dans la catalyse chymotrypsique.

En effet, KOSHLAND a montré que l'acylation de la méthionine 192 (proche de la sérine active) diminue la vitesse d'hydrolyse. De même l'inhibition de la chymotrypsine a été obtenue en bloquant la méthionine 192 (34 - ERLANGER B.F. et coll.). Ce résidu participe donc directement ou indirectement à la catalyse.

De plus, des résidus tyrosine et arginine auraient un rôle dans le maintien de la structure tertiaire de la chymotrypsine (30 - DUBE S.K. et coll.) .

On connait donc plusieurs amino-acides participant directement ou indirectement au site actif de la chymotrypsine, à savoir la sérine, les deux résidus histidine, l'iso-leucine, la méthionine, la tyrosine et l'arginine. L'acide aspartique interviendrait aussi dans la protéolyse.

Le mécanisme d'action de la trypsine a été étudié par INAGAMI ET BECHET.

La trypsine aurait le même site catalytique que l'alphachymotrypsine mais un site de spécificité différent (46 - INAGAMI T. et coll.).

En effet, elles possèdent toutes les deux un résidu sérine et deux résidus histidine dans leur centre actif.

L'hydrolyse trypsique étudiée avec le toluène sulfonyl-arginine methylester (TAME) comprend également trois étapes. Tout d'abord la liaison enzyme-substrat, puis l'acylation de la sérine avec libération de méthanol, et enfin la désacylation avec régénération de l'enzyme (11 - BECHET J.J.)

Ces réactions feraient intervenir la sérine, un résidu histidine et un résidu ε - aminé selon un mécanisme identique à celui proposé pour l'alphachymotrypsine.

D'autre part, le maintien de l'intégrité du site actif serait assuré par des résidus tyrosine (70 - RIORDAN J.F. et coll.).

Si la connaissance du fonctionnement du site catalytique de cette enzyme a manifestement progressé, on ignore tout par contre du mécanisme de sa spécificité.

En résumé, les connaissances de la structure et du mode d'action de la chymotrypsine, ont été approfondies depuis ces dix dernières années mais sont loin d'être totales.

Il serait souhaitable pour avancer davantage de ne pas confondre sous le même terme d'hydrolyse :
l'action hydrolysante de l'alphachymotrypsine sur une liaison ester ou amide et son action protéolysante sur une liaison peptidique.
(71 - DE ROECK - HOLTZHAUER Y. et coll.).
La connaissance du mécanisme réel de l'action de l'enzyme y gagnerait.

CHAPITRE II

PHARMACOLOGIE DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE ET DE SES ASSOCIATIONS MEDICAMENTEUSES.

I) - PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE.

Utilisée à l'étranger en tant qu'enzyme digestive protéolytique de substitution ou en tant qu'agent anti-inflammatoire et agent de débridement des plaies, la trypsine seule ne fait plus l'objet de spécialités pharmaceutiques en France. Elle a été supplantée par l'alphachymotrypsine qui présente des avantages indiscutables (63 - NEUMAN M.).

- elle s'obtient aisément sous forme purifiée cristalline.
- elle est peu toxique.
- elle n'est pas dégradée au cours du transit digestif (93 - WOHLMAN A. et coll.).
- elle ne libère pas la sérotonine stockée dans les plaquettes comme le font les autres enzymes protéolytiques.
- elle ne modifie en rien le processus de la coagulation (les modalités de son action fibrinolytique seront étudiées plus loin).
- elle hydrolyse un plus grand nombre de liaisons.

1°) Rôle dans la digestion

Le rôle de l'alphachymotrypsine dans le processus de liquéfaction des aliments est connu depuis longtemps.

Il nous parait donc superflu d'insister sur ce point.

2°) Action fibrinolytique

Bien que la chymotrypsine ne modifie en rien le processus de la coagulation (à la différence de la trypsine), elle peut cependant dissocier la fibrine déjà formée.

Cette action fibrinolytique est capable d'inhiber in vitro les facteurs anti-fibrinolytiques existant dans le sang.

Cette inhibition favoriserait non seulement l'action fibrinolytique de la propre chymotrypsine des malades, mais aussi, fait plus important, l'action de la fibrinolyse naturelle et des endo-peptidases existant dans les mastocytes. Par ailleurs, chez le chien (in vivo) SHERRY et coll. (85) ont provoqué des thromboses vasculaires , à l'aide de ligatures, et ont rétabli la circulation grâce à l'action fibrinolytique et même thrombolytique de l'alphachymotrypsine.

Cette propriété très importante mais encore mal connue est sûrement une des pièces maîtresses de son activité thérapeutique et des applications auxquelles elle a donné lieu.

3°) Action anti-inflammatoire

En effet, c'est cette propriété qui a été mise en avant pour expliquer l'action anti-inflammatoire de cette enzyme que l'on retrouve dans les foyers inflammatoires avec d'autres protéases actives à pH neutre ou alcalin (notamment la trypsine).

Il n'est peut être pas inutile de préciser ici quelques données concernant la réaction inflammatoire.

L'inflammation est une réaction locale, non spécifique, qui peut être provoquée par des agents très divers allant des micro-organismes aux facteurs physiques en passant par les facteurs chimiques.

C'est une réaction de défense de l'organisme qui peut disparaitre spontanément ou conduire à des lésions irréversibles (10 - BASTIDE P. et J.) .

La réaction inflammatoire est un phénomène complexe. C'est un processus tissulaire aux composantes multiples : vasculaires, cellulaires, humorales.

Elle se caractérise, schématiquement, par la succession de 4 stades (61 - MARCY R.):

- En réponse à une action irritante, il se produit au niveau des tissus en cause une vaso-dilatation artériolaire se traduisant par l'apparition d'un érythème. C'est la réaction initiale.

Cette vaso-dilatation artériolaire s'accompagne d'une stase capillaire. Le plasma s'échappe à travers les parois des capillaires par suite des troubles de leur perméabilité (phase cellulaire d'hyper-perméabilité vasculaire), et gagne les espaces extracellulaires. A l'échelle microscopique, cette filtration plasmatique s'accompagne d'une diapédèse leucocytaire (phase lympho-plasmocytaire).

- Dans un deuxième stade, l'accumulation du plasma constitue plus ou moins rapidement un oedème tissulaire.

- Le stade suivant peut voir apparaitre la suppuration et la nécrose. Puis apparaissent de jeunes fibroblastes qui, en se multipliant, forment des masses cellulaires au sein desquelles s'insinuent de fins capillaires néo-formés. Cet ensemble tissulaire constitue le tissu de granulation ou granulome.

- Au dernier stade, il y a dégénérescence fibreuse de ce néo-tissu.

Des sensations douloureuses accompagnent ces différents phénomènes dont l'apparition et le développement sont sous la dépendance, encore mal définie il est vrai, de médiateurs chimiques de constitution simple comme l'histamine et la sérotonine, ou complexe comme la leucotaxine.

L'action anti-inflammatoire de l'alphachymo - trypsine s'exerce surtout pendant la phase aigüe lorsque les phénomènes vasculaires et la diapédèse prédominent.

Quand la réaction cellulaire (macrophages , fibroblastes) apparaît, cet effet est plus réduit (48 - JANBON M.V. et coll.).

Lors de la maladie rhumatismale, la disparition des dépôts de fibrine abondants au lieu de l'inflammation s'accompagne d'une amélioration voire d'une guérison.

Pour certains (47 - INNERFIELD J.W.) l'action thrombolytique serait à l'origine de cet effet.

Pour d'autres (BARCELO et SANS SOLA cités par VALDECASAS - 89) l'action fibrinolytique indirecte serait en cause.

Mais cette activité fibrinolytique ne se manifesterait que pour une certaine gamme de concentrations en anti- inflammatoire. En deçà , la quantité est trop faible pour induire la fibrinolyse. Au delà, l'activité anti-protéase, donc anti-plasmine, domine la propriété fibrinolytique.

BARBRY (cité par VALDECASAS-89) considère comme plus probable une action directe de l'enzyme sur la substance fondamentale du tissu conjonctif.

La chymotrypsine s'attaquerait aux liens défectueux formés au cours des processus inflammatoires entre les divers constituants chimiques des tissus (25 - DELAUNAY A. et coll.) . Elle entrainerait une fluidification des mucopolysaccharides acides, tels que les acides hyaluronique, chondroïtine- sulfurique et mucoïtine - sulfurique.

Presque toutes les enzymes anti-inflammatoires étant des enzymes protéolytiques (sauf l'alpha-amylase) (31 - DUHAMEL B. et coll.), il semble que ces deux actions soient intimement liées : la chymotrypsine agirait comme dépolymérase * sur le squelette protéique du foyer inflammatoire et permettrait ainsi une augmentation de la perméabilité.

De nombreux auteurs ne partagent pas ce point de vue (DE BARBIERI , GUZZON et SCEVOLA cités par SCALABRINO; 86 - SIMONNET M. et coll.) car l'action anti-inflammatoire subsisterait même chez des chymotrypsines dont l'action protéolytique a été entravée soit par un inhibiteur plasmatique, soit par un inhibiteur chimique (6 - BAR D.).

Certains ont tenté d'interpréter les phénomènes anti-inflammatoires à la lumière d'une action endocrine possible.

En fait, comme nous l'avons déjà indiqué, l'action anti-inflammatoire endocrinienne est toujours accompagnée d'une inhibition de la cicatrisation, ce qui n'est pas observé avec la chymotrypsine.

Toutes les expériences tendant à appuyer cette thèse sont demeurées négatives. L'action anti-inflammatoire se manifeste avec la même intensité chez l'animal normal et chez l'animal surrénalectomisé ou même chez l'animal surrénalectomisé et hypophysectomisé (ADAMKIEWCS et coll. , COHEN, BOLLER et coll., cités par VALDECASAS-89).

* Nota : La polymérisation est la base moléculaire des réactions de stress. Elle est responsable du vieillissement et d'un grand nombre de maladies.
La dépolymérisation est un mécanisme naturel de défense qui doit être augmenté dans certaines conditions pour fournir le maximum de forces susceptibles de s'opposer aux stress. (62 - MOSS J.N. et coll.) .

La formation de fragments protéiques de dimension moyenne résultant de l'activation de diverses protéines (telle la carboxypeptidase B) a été invoquée également.

Il est bien évident que, pour intéressants qu'ils soient, les divers renseignements sur les mécanismes d'action de l'alpha-chymotrypsine ne peuvent complètement satisfaire.

Ils sont d'un caractère trop hypothétique, ce qui d'ailleurs ne saurait surprendre attendu que beaucoup de données concernant la biochimie des tissus enflammés nous échappent encore.

Mais la réalité même de l'action anti-inflammatoire de l'alphachymotrypsine ("amplement démontré" selon VALDECASAS 89) est mise en question (23 - COLMAN R.W.) et, de ce fait, rend caduques les diverses hypothèses mises en avant.

En effet, selon COLMAN beaucoup d'études expérimentales n'ont pas été contrôlées (59 - MALOW L.) et font appel à des doses supérieures à celles utilisées cliniquement (37 - AKIM A.A. et coll.) tandis que d'autres expériences n'ont manifesté aucun effet sur l'inflammation (91 -WAGALTER H.)

Bien plus, LWOFF et BOISSIER (58) utilisent la trypsine comme agent phlogogène pour déclencher une inflammation localisée chez le rat.

L'expérimentation animale peut donc conduire à des résultats contradictoires s'expliquant de diverses manières :

- de grandes différences existent, comme on le sait, entre les résultats de l'expérimentation sur l'animal et ceux obtenus en pathologie humaine.

- ces différences se rencontrent aussi suivant l'espèce animale (rat, cobaye, lapin, chien, etc ...) et dans la même espèce d'un individu à l'autre, en fonction de la race, de la dose d'enzyme injectée, des éventuelles carences pré-existant en protides, en vitamines (surtout A et C), en hormones, le pH et la température eux-mêmes peuvent intervenir (HAKIM cité par SCALABRINO - 78).

- certains effets dépendent exclusivement du degré de pureté de l'enzyme utilisée, de ses doses, de la voie d'administration.

On peut aussi penser que les inflammations expérimentales ne parviennent pas à reproduire exactement les inflammations observées cliniquement vis-à-vis desquelles l'alphachymotrypsine se montrerait anti-inflammatoire, mais elles sont néanmoins le seul moyen dont nous disposons actuellement pour étudier ces phénomènes.

4°) Action anti-oedémateuse

L'alphachymotrypsine est aussi à l'origine d'autres phénomènes thérapeutiques indirects. C'est ainsi qu'elle s'est montrée anti-oedémateuse.

Cette action n'est pas toujours un phénomène banal, secondaire de l'action anti-inflammatoire.

La résorption de l'oedème s'observe, en effet, en clinique dans des cas où les phénomènes inflammatoires sont faibles voire même absents. Elle provient probablement d'une augmentation du drainage lymphatique (la perméabilité capillaire n'est pas modifiée) : il s'agit vraisemblablement de l'hydrolyse enzymatique des protéines qui produisent la stase lymphatique dans le foyer inflammatoire. L'effet final résulte de la diminution à la fois de la concentration en protéines et du volume du liquide d'oedème.

5°) Débridement des plaies

Utilisée en usage externe en vue de détruire les résidus protéiques dénaturés, l'alphachymotrypsine appliquée localement sur les surfaces à vif ou sur les muqueuses entraîne une inhibition des kinines tissulaires libérées lors de l'agression tissulaire (bradykinine, substance P). La dissolution des exsudats protéiques ou des protéines coagulées permet ainsi un " nettoyage" des blessures et rend perméables les conduits ou les petits canaux obstrués.

Les tissus sains sont protégés de la destruction grâce à la présence d'inhibiteurs. Toutefois ces inhibiteurs présents dans les tissus et le plasma forment avec l'enzyme un ensemble inactif qui peut se scinder par la suite en libérant l'enzyme encore active (d'où l'importance des doses employées (8 - DE BARBIERI A.).

L'alphachymotrypsine agit également sur les substances intercellulaires qui cependant ne sont pas douées d'une vie active cellulaire. C'est ainsi que dans l'opération de la cataracte, elle provoque une lyse des fibres de la zonule du cristallin (zonulolyse enzymatique) et par là facilite l'extraction de ce dernier (9 - BARRAQUER J.).

Selon COLMAN (23), l'ophtalmologie paraît être le domaine le plus marquant de l'activité protéolytique de cet enzyme.

In vitro, cette dissolution des protéines serait très facile à observer.

In vivo, elle est la base de maintes applications cliniques que nous exposerons plus loin.

6°) Cicatrisation

L'usage de l'alphachymotrypsine comme topique entraîne une nette accélération du processus de cicatrisation.
En réduisant l'oedème, elle permettrait aux lèvres d'une plaie de s'accoler de façon plus étroite.

Ce phénomène est d'autant plus surprenant que toutes les substances anti-inflammatoires inhibent habituellement la cicatrisation des blessures en prolongeant leur durée
(89 - VALDECASAS F.G.).

7°) Fluidification

L'action mucolytique sur les sécrétions bronchiques et les crachats a été démontrée chez les sujets atteints d'affection respiratoires (63 - NEUMAN M.).

8°) L'alphachymotrypsine inhiberait aussi les exo-toxines bactériennes.

En résumé, les possibilités d'action pharmacologique de l'alphachymotrypsine sont aussi nombreuses que difficiles à préciser dans l'état actuel des connaissances biochimiques.

A côté des effets déjà décrits : liquéfaction des exsudats, nettoyage des blessures, perméabilisation de conduits, lyse des fibres de la zonule du cristallin, d'autres effets, très difficiles ou impossibles à interprèter actuellement se sont manifestés :
il s'agit de l'action fibrinolytique qui serait à l'origine des effets anti-inflammatoires, de l'action anti-oedémateuse et de l'action cicatrisante.

Ces phénomènes sont eux-mêmes sous la dépendance des anti-enzymes présents dans l'organisme, soit dès le départ, soit parce que l'enzyme a directement stimulé leur formation.

II)-LES VOIES D'ADMINISTRATION.

Dès que l'on aborde la pharmacologie des enzymes, on se heurte aux problèmes de perméabilité et de pénétration.

En effet, de nombreux facteurs comme les voies d'administration, les doses, leur répétition, sont susceptibles de provoquer l'un ou l'autre des effets décrits.

1°) Usage local.

Nous l'avons vu, l'usage local de l'alphachymotrypsine favorise le débridement des plaies : c'est le "nettoyage enzymatique".

Actuellement, les pommades prescrites sont surtout utilisées pour combattre les oedèmes traumatiques.

2°) Voies parentérales.

C'est grâce à l'administration par voie intraveineuse dans le traitement des phlébites , que ses propriétés fibrinolytiques ont été découvertes.

Sa présence dans le torrent circulatoire est de courte durée (quelques minutes), mais cette disparition dans le sang n'est peut-être pas dûe à sa diffusion, mais plutôt à son inactivation qui peut d'ailleurs n'être que temporaire : sa libération s'effectuerait au niveau où l'enzyme va agir.

De fait, l'activité de l'alphachymotrypsine se conserve dans le sang, in vitro. Compte tenu de sa disparition rapide et de ses effets dans les tissus, il est assez probable qu'elle se propage rapidement à travers les capillaires.

La capacité anti-chymotrypsique des tissus, ainsi que l'existence d'endopeptidases qui leur sont propres, ne permettent pas de suivre le cours de l'enzyme administrée. Le marquage, à l'iode radioactif par exemple, ne résoud pas davantage le problème car nous ne sommes pas sûrs que la présence de l'atome traceur indique réellement la présence de l'enzyme actif.

De ce fait, il n'est pas possible d'affirmer actuellement qu'elle traverse ou non la membrane cellulaire et pénètre à l'intérieur des cellules, d'autant plus qu'il est admis classiquement depuis E. ABDERHALDEN que les cellules vivantes résistent à l'action des endo-peptidases pancréatiques.

L'administration par voie rectale a été étudiée, chez le lapin, par KABACOFF B.L. et coll. (49) qui l'ont comparée aux voies intra-intestinale et intra-musculaire.

C'est la voie rectale qui permet d'obtenir les meilleurs taux sanguins de chymotrypsine (en 1 heure) tandis qu'avec les deux autres les résultats sont comparables. Selon cet auteur, la chymotrypsine est absorbée sous une forme enzymatique active.

Chez la souris les voies intra-veineuse, rectale et intra-péritonéale donnent des valeurs analogues.

La voie intra-musculaire à laquelle les cliniciens ont eu recours très souvent a été une source de déboires sérieux.

En effet, les produits commerciaux se comportaient souvent comme allergènes et entrainaient des chocs anaphylactiques, de plus en plus fréquents à mesure que leur usage se répandait (45 - HOWELL I.L. ; 57 - LIEBOWITZ D. et coll.).

Ces graves inconvénients imputés au degré de pureté des échantillons administrés sont actuellement en régression. La voie intra-musculaire parait favoriser une rapide propagation de l'enzyme, tout comme la voie sous-cutanée retenue par certains auteurs.

Mais les accidents sévères observés lors de certaines administrations parentérales ont conduit à envisager la voie orale.

3°) Voie orale.

Il était admis que les polypeptides du fait de leur poids moléculaire et de leur nature ne pouvaient pas - en général - être absorbés per os.

Cependant, il existe actuellement de nombreuses preuves pharmacologiques et cliniques de l'absorption digestive des enzymes protéolytiques et de leur action " systémique " par cette voie. Administrées sous enrobage entérique afin de les protéger de l'acidité gastrique, on les a retrouvées pendant une heure environ dans le sang et les tissus, à des concentrations thérapeutiques, mais pour cela il faut choisir des enzymes stables, bien purifiées et les utiliser à des doses assez fortes.

L'alphachymotrypsine répondant à ces conditions a fait l'objet de nombreux travaux.

AVAKIAN a montré que son taux plasmatique augmentait de façon significative 4 heures après son administration. (3 - AVAKIAN S.).

SENECA a confirmé cette assertion (81 et 83 - SENECA H. et Coll.) .

En outre, la démonstration aurait été faite par marquage à l' ^{131}I. La détermination par auto-radiographie électrophorétique aurait permis de retrouver l' ^{131}I dans le sang des sujets traités per os (63 - NEUMAN M.). On sait toutefois les réserves qu'appelle cette méthode.

Néanmoins, certains pensent que l'absorption de cette grosse molécule sous forme active n'a pas été démontrée de façon convaïncante; en effet, chez les sujets à jeun, traités per os, les taux d'estérase endogène en début d'expérience varient de façon considérable car les sécrétions pancréatiques diffèrent d'un sujet à un autre.

III)- MECANISMES POSSIBLES DES ACTIVITES DECRITES.

Les propriétés thérapeutiques envisagées semblent être en relation avec les deux modes d'action de l'alphachymotrypsine : direct et indirect (62 - MOSS J.N.) qui résultent de sa nature protéique et de sa structure.

Selon VALDECASAS (89), l'action directe se traduit :

-soit par la destruction de substances protéiques ayant une activité spécifique

-soit par la destruction de résidus protéiques non spécifiques.

Il ne parait pas inutile de signaler à ce propos que la chymotrypsine , comme on pouvait s'y attendre, détruit l'action spécifique des protéines ou des polypeptides hormonaux. Il est difficile toutefois d'apprécier l'importance physiologique ou thérapeutique de ce fait.

L'action indirecte se traduit par la production de fragments polypeptidiques doués d'une activité biologique et résultant de l'activation de diverses protéines (le passage du chymotrypsinogène à la chymotrypsine est un exemple de ce processus).

Certains effets, cependant, restent actuellement difficiles ou impossibles à interpréter : il s'agit de l'action fibrinolytique , de l'effet anti-inflammatoire, et de l'action anti-oedémateuse.

IV)- LES INDICATIONS CLINIQUES

Elles découlent des propriétés pharmacologiques que nous venons d'étudier, particulièrement de son action anti-inflammatoire, de son aptitude à nettoyer les plaies et à favoriser la cicatrisation.

L'alphachymotrypsine est essentiellement prescrite dans les inflammations primaires, c'est à dire lorsque la réponse inflammatoire immédiate se produit au lieu même de l'action directe du stimulus inflammatoire externe et reste localisée au tissu affecté.

C'est le cas des oedèmes post-traumatiques (contusions, hématomes, entorses, luxations, plaies, oedèmes post-chirurgicaux), des infections avec réaction tissulaire locale (brûlures, bronchites, pharyngites, gastrites, duodénites, salpingo-ovarites, prostatites, uréthrites, etc ...) .

Elle présente l'avantage de n'exercer aucune agression sur la muqueuse digestive (absence d'effet ulcérigène) à la différence des anti-inflammatoires agissant à la fois sur l'inflammation primaire et secondaire (type corticostéroïdes , phénylbutazone etc.)

C'est pourquoi elle a été proposée dans le traitement des gastro-duodénites et des ulcères.

D'une manière analytique, ses indications cliniques sont très diverses et touchent de nombreux domaines :

- la traumatologie (entorses, hématomes, contusions, etc ..)
- la pneumologie (bronchorrhées, bronchites chroniques . etc ..)
  (19 - BRUCE R.A. et coll.)
- l'otorhinolaryngologie (chirurgie, rhinites, etc ...)
  (4 - AZCARATE RANGEL C. ; 66 - OMEZ Y.E.; 90 - VIALAS M.)
- la stomatologie (extractions dentaires etc ..)
- la dermatologie - phlébologie
- la chirurgie esthétique (16 - BOGNER R.L. et coll. ; 32 - EDELSTEIN M.M.)
- la gynécologie et l'obstétrique
- la gastro - entérologie
- l'urologie (uréthrites, cystites, etc ..(91 - WAGALTER H.)
- l'ophtalmologie (9 - BARRAQUER J. ; 76 - SALLMAN von L.)

Le maximum d'efficacité s'observant dans l'administration prophylactique (prévention des hématomes et des oedèmes post-opératoires et post-traumatiques), il est recommandé de commencer le traitement 48 heures avant une intervention.

En thérapeutique curative, l'administration doit être précoce pour être efficace.

V)-LES ASSOCIATIONS MEDICAMENTEUSES DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE.

S'appuyant sur le fait que l'alphachymotrypsine est absorbée au niveau du tractus intestinal, qu'elle agit sur la perméabilité et augmente ainsi les échanges entre les tissus et le milieu intérieur (1 - AMBRUS J.L. et coll.; 60 - MARCA G. et coll. ; 81 - SENECA H. et coll.; 94 - WOHLMAN A. et coll.) plusieurs auteurs ont cherché à associer cette enzyme à divers médicaments.

Ces associations veulent répondre à deux impératifs complémentaires :

- favoriser la diffusion d'un médicament et accroître ainsi son activité.
- renforcer une action thérapeutique donnée en ayant recours à un médicament dont les propriétés pharmacologiques recoupent celles de l'alphachymotrypsine.

1°) Favoriser l'absorption et la diffusion d'un médicament et accroître ainsi son activité :

C'est le cas des associations alphachymotrypsine-tétracycline et alphachymotrypsine-barbituriques (Tableau II).

Cette action favorable peut également permettre de diminuer les doses efficaces du médicament associé : l'association acide acétyl-salicylique-alphachymotrypsine en est un exemple.

Des études récentes ont montré que la chymotrypsine(et la trypsine) associée à des antibiotiques augmentait leur taux plasmatique. Mais le taux sérique d'antibiotique n'a qu'une importance relative et l'efficacité est conditionnée par la concentration obtenue dans les organes, plus particulièrement dans ceux intéressés par le processus pathologique.

Etant donné l'importance que revêt l'obtention d'une concentration suffisante d'antibiotique au niveau du foyer d'infection, de nombreux facteurs d'absorption et de diffusion ont été envisagés. Parmi ceux-ci a été préconisée l'alphachymotrypsine, comme élément adjuvant de l'antibiothérapie.

D'une façon générale, les taux d'antibiotiques (notamment la tétracycline) se sont montrés plus importants chez les animaux recevant l'enzyme. Ce fait est plus marqué chez les animaux ayant reçu l'enzyme par voie orale que par voie parentérale (68 - PECILE A. et coll.).

ROUBERTOU J. et coll. (73) , THEVENOT A. et coll. (88) ,ayant étudié l'influence de l'alphachymotrypsine sur la distribution de la tétracycline chez le rat porteur d'un granulome expérimental, ont pensé que l'enzyme pourrait agir sélectivement sur la perméabilité de certaines membranes.

En effet, SARKAR N. et FOSDICK L.S.(77) ont constaté que la chymotrypsine agissait sur la répartition des protéines plasmatiques, en provoquant une diminution des albumines et une augmentation des globulines.

Des fractions globuliniques sont susceptibles de jouer un rôle dans la régulation de la perméabilité capillaire et, sans éliminer l'hypothèse d'une action directe de l'enzyme sur cette perméabilité, on peut concevoir que la chymotrypsine agirait sur la formation des globulines actives par action protéolytique partielle.

D'autre part, la tétracycline diffuse dans les différents territoires sous forme libre ou sous forme liée.

L'action des enzymes sur les protéines du plasma, les membranes biologiques ou les liquides d'exsudat, pourrait entraîner une augmentation de leur affinité vis-à-vis de la tétracycline et avoir pour conséquence une fixation accrue de l'antibiotique.

Il est vraisemblable que ces deux hypothèses ne sont pas exclusives et que l'on peut envisager un double mécanisme d'action incluant une augmentation de la perméabilité à l'antibiotique et une augmentation de l'affinité de l'antibiotique pour les protéines de liaison.

L'enzyme semble capable de faciliter presque sélectivement l'absorption intestinale de la tétracycline (68 - PECILE A. et coll.).

Cet effet est d'une importance pratique considérable parce que non seulement l'action de l'antibiotique se trouve favorisée mais les effets néfastes d'un reste excessif de l'antibiotique dans l'intestin sont également réduits. On doit rappeler, à ce propos, qu'un fort pourcentage de tétracycline administrée per os n'est pas absorbé et que la quantité présente dans l'intestin peut alors altérer l'équilibre normal de la flore bactérienne (68 - PECILE A. et coll.).

En outre, la tétracycline qui stimule la phagocytose à faibles concentrations (inférieures à 7 µg par ml) voit son effet augmenter en présence de chymotrypsine (82 - SENECA H. et coll.).

L'association peut aussi viser à complèter l'action détergente de l'enzyme sur les plaies avec un antibiotique bactéricide dont le spectre d'activité est très étendu.

L'augmentation de la teneur dans le sang de certains médicaments sous l'action de l'enzyme a été retrouvée au niveau du cerveau (82 - SENECA H. et coll.).

Chez la souris, la chymotrypsine administrée par voie intra-péritonéale, intra-veineuse ou rectale, double la durée de la narcose au pentobarbital. Les taux cérébraux des barbituriques se sont montrés multipliés par 2,5.

La chymotrypsine par voie intra-péritonéale augmente de 58 p.100 les taux cérébraux de l'imipramine administrée per os.

Cette action diffusante mise en évidence expérimentalement a été également observée en clinique.

2°) Renforcer une action thérapeutique donnée en ayant recours à un médicament dont les propriétés pharmacologiques recoupent celles de l'alphachymotrypsine.

Par exemple :

- l'association acide acétylsalicylique-alphachymotrypsine : leurs actions anti-inflammatoires sont complémentaires et de plus l'action antalgique de l'acide acétylsalicylique est renforcée par la chymotrypsine qui agit comme agent de diffusion.

- l'association phénylbutazone-alphachymotrypsine: la phénylbutazone agit sur les phénomènes vasculaires de l'inflammation en diminuant la perméabilité capillaire, et l'enzyme hâte la résorption de l'oedème en dissociant le réseau de fibrine.

- avec le téclothiazide, nous avons une association anti-oedèmateuse : l'action salidiurétique de ce composé permet de drainer les surcharges hydriques du compartiment intra-cellulaire.

- l'hypothèse d'une action directe de l'alphachymotrypsine sur la perméabilité capillaire a conduit à associer l'enzyme avec une molécule dérivée de la quercétine dont l'activité veinotrope est bien connue.

- avec la noscapine connue pour ses propriétés antitussives, nous avons une médication des affections de l'arbre respiratoire.

Le tableau II, ci-après, présente la liste des associations que nous venons de citer:

	Noms communs	Noms commerciaux ®	Formes Pharmaceutiques	Laboratoire fabricant
ALPHACHYMOTRYPSINE EN ASSOCIATION AVEC :	Antibiotiques -Tétracycline	CHYMOCYCLINE	Comprimés	S.P.R.E.T. Mauchant
	-Framycétine	CHYSANE	Pommade	Pharmascience
	Barbituriques -Sécobarbital	REPOSAL	Comprimés Suppositoires	Martinet
	Anti-inflammatoires			
	-Acide acétylsalicylique	CHYMALGYL	Comprimés	Martinet
		CHYMO-ALCACYL	Comprimés	Wander
	-Phénylbutazone	ALPHA-KADOL	Pommade	Midy
	Diurétique - Téclothiazide	CHYMODREX	Comprimés	S.P.R.E.T Mauchant
	Veinotonique -Quercétine	CHYMADOL P.	Comprimés	Lederle-Novalis
	Antitussif -Noscapine	CHYMOGRIP	Comprimés	Martinet

Tableau II : Associations médicamenteuses auxquelles l'alphachymotrypsine a donné lieu.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS.

Nos travaux personnels nous ont conduit à reprendre quelques points précédemment exposés et à étudier d'autres types d'associations afin de retrouver éventuellement l'action favorable obtenue avec certains médicaments.

L'étude pharmaceutique que nous avons entreprise, a pour but de mettre en évidence l'action de l'alphachymotrypsine en association avec divers médicaments dont l'action pharmacodynamique est déjà bien connue.

Nous avons choisi quelques associations se prêtant à une étude in vivo soit sur animal éveillé, soit sur animal anesthésié.

D'autres associations ont été testées in vitro.

Dans l'exposé des expérimentations que nous avons pratiquées in vivo, nous distinguerons successivement les modalités générales de nos essais, puis l'étude des diverses associations envisagées : anti-inflammatoires, anti-histaminiques, hypnotiques, sédatives et cholérétiques.

Au cours de nos essais in vitro, nous avons associé l'alphachymotrypsine à des agents contracturants tels que l'acétylcholine et le chlorure de baryum, puis à leurs antagonistes respectifs.

Nous allons maintenant exposer de façon plus détaillée les divers chapitres envisagés.

CHAPITRE I

MODALITES EXPERIMENTALES GENERALES.

L'alphachymotrypsine que nous avons utilisée pour toutes nos expérimentations titre en activité enzymatique 635 Unités chymotrypsiques spécifiques (A.T.E.E.) par mg.*

Quatre procédés d'administration ont été retenus :

- la voie digestive selon deux modes
  - . la voie orale
  - . la voie intra-duodénale
- deux voies parentérales
  - . la voie sous cutanée
  - . la voie intra-péritonéale

Nous savons la controverse qui s'est établie au sujet de la voie orale (49 - KABACOFF B.L. et coll.).

Son usage généralisé permet de penser tout d'abord que l'enrobage entérique assure une protection efficace vis-à-vis de l'acidité gastrique et ensuite que les effets observés militent en faveur d'une absorption intestinale.

Nous avions envisagé de traiter les animaux avec de fins granules glutinisés, mais il ne nous a pas été possible d'expérimenter cette forme médicamenteuse qui aurait permis d'éviter une certaine altération lors du passage de l'enzyme dans l'estomac.

* Nota:- A.T.E.E. = Acétyl - Tyrosine - Ethyl - Ester

De ce fait, nous avons administré l'alphachymotrypsine à doses élevées (50 et 100 mg/kg) simplement en suspension dans un mélange à parties égales d'eau et de sirop, et nous avons cherché à déterminer son taux sérique.

DOSAGE DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE DANS LE SERUM.

La technique utilisée est celle préconisée par le Département Biochimique des Laboratoires BOEHRINGER-MANNHEIM (Réf. 15951 TCAC).

Principe

La chymotrypsine catalyse la réaction d'hydrolyse du substrat carboxypropionyl-phénylalanine-p-nitranilide en carboxypropionyl-phénylalanine et p-nitraniline.

La quantité de p-nitraniline libérée en 30 minutes est proportionnelle à l'activité de la chymotrypsine et sa coloration jaune peut être mesurée par spectrocolorimétrie à la longueur d'onde de 405 nanomètres.

Protocole

- Quinze rats mâles de souche Wistar , d'un poids moyen de 260 g sont répartis en 3 lots homogènes de 5 animaux (lot 1, lot 2, lot 3)

Le lot 1 (témoins) reçoit un mélange à parties égales d'eau et de sirop simple.

Les lots 2 et 3 reçoivent l'alphachymotrypsine (α-C.T.) à la dose de 100 mg/kg par voie orale.

Les prélèvements de sang sont effectués :

30 minutes après pour les lots 1 et 2

60 minutes après pour le lot 3.

La technique du dosage est la suivante :

- dans un tube à essai, introduire :

2 ml de la solution 1 (Tampon Tris 0,5 M, pH 7,5; $CaCl_2$ 66 m M)

0,2 ml de la solution 2 (Carboxypropionyl - phénylalanine-p-nitranilide 48 m M.).

- mélanger et placer 5 minutes au bain-marie.
- ajouter 0,2 ml de l'échantillon de sérum et mélanger.

Au moyen d'un spectrocolorimètre, on lit immédiatement l'extinction E_1 , puis trente minutes après l'extinction E_2 .

- on calcule la différence d'extinction

$$\Delta E = E_2 - E_1$$

Les mesures sont effectuées à 25°C, avec une cuve de 1 cm d'épaisseur et une longueur d'onde de 405 nm (400 - 420 nm).

Calculs

Pour obtenir les valeurs de l'activité de la chymotrypsine, on peut utiliser la formule suivante :

soit $\Delta E \times 40,4 = mU/ml$ dans la prise d'essai

soit se référer à une table de correspondances.

Résultats : Tableau III

Produits administrés	Lot 1 témoins	Lot 2	Lot 3
	-	α-C.T. 100 mg/kg voie orale	
Délai pour le prélèvement	30 minutes		1 heure
rat n° 1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0

Tableau III : Dosage de l'alphachymotrypsine après administration, par voie orale. (résultats exprimés en mU/ml)

Conclusions

La présence d'alphachymotrypsine n'a pu être décelée dans aucun des lots d'animaux traités.

Faut-il penser que l'enzyme n'a pas été absorbée ?

Nous ne saurions partager ce point de vue. Des expériences ultérieures nous le confirmerons.

L'alphachymotrypsine est assez vite fixée par des inhibiteurs présents dans le sang. Mais l'ensemble inactif ainsi formé est capable de se scinder et de libérer ensuite l'enzyme encore active (7 - DE BARBIERI A.).

CHAPITRE II

ACTION ANTI-INFLAMMATOIRE DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE ET DE SES ASSOCIATIONS.

L'usage des enzymes protéolytiques du pancréas comme agents anti-inflammatoires s'est particulièrement développé durant ces dernières années.

De nombreuses publications concernant la valeur thérapeutique, en médecine clinique, de l'alphachymotrypsine et de ses associations ont servi d'arguments dans la controverse qui s'est établie à leur propos.

L'alphachymotrypsine agissant durant la phase primaire de l'inflammation, nous avons eu recours pour cette étude aux méthodes classiques mettant en oeuvre les réactions d'oedème chez le rat :

- tout d'abord l'oedème localisé au niveau de la patte postérieure,
- puis l'oedème généralisé.

A)-OEDEME LOCALISE.

Principe

Les rats reçoivent sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche 0,1 ml d'une substance irritante. L'importance de la réaction oedémateuse ainsi déclenchée est évaluée quantitativement en mesurant l'augmentation du volume de la patte au moyen du pléthysmographe UGO-BASILE.

Technique opératoire

Des rats mâles, de souche Wistar, d'un poids de 100 à 150 g sont répartis en lots homogènes.

Les animaux recevant les substances étudiées, par voie orale, sont privés de nourriture 3 heures avant le traitement.

Les animaux témoins ne reçoivent que l'agent phlogogène.

Parmi les divers agents phlogogènes habituellement employés, notre choix s'est porté sur une suspension de kaolin à 10 p.100 dans une solution de méthyl-cellulose à 1 p.100 (43 - HILLEBRECHT J.) . Le kaolin dénature les protéines et crée un oedème que les dérivés pyrazolés antagonisent bien.

Le volume de la patte est mesuré par pléthysmographie aussitôt après l'injection de l'agent irritant, puis 1 h, 2 h, 3 h, et 4 h après. Le pléthysmographe UGO BASILE est constitué d'une cellule remplie de mercure dans laquelle la patte du rat est plongée jusqu'au niveau de l'articulation tibio-tarsienne. Un transducteur électrique enregistrant les modifications du niveau du mercure transmet ces mesures à l'appareil.

L'appareil est étalonné de manière à pouvoir lire directement sur le cadran du galvanomètre le volume réel de la patte traitée.

Calculs

Pour chaque animal, l'augmentation du volume de la patte est mesurée au bout de : 1 h, 2 h, etc ... et exprimée en pourcentage par rapport au volume initial

Soit par exemple à 1 heure : $\frac{V_1 - V_o}{V_o} \times 100$ où V_o est le volume initial aussitôt après l'injection de l'agent phlogogène, et V_1 le volume de la patte au bout d'une heure.

A partir de ces chiffres, nous avons ensuite déterminé, pour un même lot, les pourcentages moyens d'augmentation du volume en fonction du temps.

Conditions d'administration

Nous avons testé l'action de l'alphachymotrypsine administrée 30 minutes avant l'injection du kaolin, seule et à doses croissantes :

- par voie orale, en suspension dans un mélange à parties égales d'eau et de sirop simple, aux doses de 10, 50 et 100 mg/kg.

- par voie sous-cutanée, au niveau du dos, en suspension dans le soluté isotonique de chlorure de sodium, aux doses de 2, 10, 50 mg/kg.

La phénylbutazone est administrée par voie orale, en suspension dans un mélange à parties égales d'eau et de sirop simple, à la dose de 100 mg/kg. Cette dose est assez faible afin que son association avec l'enzyme puisse éventuellement manifester une action anti-inflammatoire supérieure.

Les animaux reçoivent l'association par voie orale aux doses respectives de 50 mg/kg pour l'alphachymotrypsine et de 100 mg/kg pour la phénylbutazone.

Résultats a) Action de l'alphachymotrypsine seule, par voie orale (Tableau IV) et par voie sous cutanée (Tableau V).

Nombre de rats par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Noms	Doses mg/kg	Voie	Pourcentage d'augmentation de l'inflammation en fonction du temps 1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
7	120	Témoins	-	-	27	54	53	44	41
6	130	∝ -C.T.	10	voie orale	23	58	53	53	49
12	130	∝ -C.T.	50		32	67	63	60	57
6	140	∝ -C.T.	100		41	71	68	66	62

Tableau IV : Action de l'alphachymotrypsine administrée par voie orale vis à vis de l'oedème de la patte déclenché par le kaolin.

Les faibles écarts entre les lots ne paraissent pas significatifs et semblent devoir être imputés aux limites de la méthode.

Nombre de rats par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Noms	Doses mg/kg	Voie	Pourcentage d'augmentation de l'inflammation en fonction du temps 1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
5	140	Témoins	-	-	39	60	81	65	57
5	140	∝ -C.T.	2	voie sous cutanée	47	68	85	78	70
12	150	∝ -C.T.	10		32	52	59	56	53
10	160	∝ -C.T	50		37	54	59	58	54

Tableau V : Action de l'alphachymotrypsine administrée par voie sous-cutanée vis -à-vis de l'oedème de la patte déclenché par le kaolin,

La très légère inhibition observée au bout de 3 heures aux doses les plus élevées ne semble pas significative.

Les pourcentages obtenus avec 10 mg/kg et 50 mg/kg étant quasiment identiques l'augmentation des doses n'intervient pas.

b) Action de l'association administrée par voie orale (Tableau VI).

Le lot témoin ne reçoit que la suspension phlogogène.

Parmi les lots traités par voie orale

- le premier reçoit l'alphachymotrypsine à 50 mg/kg
- le deuxième reçoit la phénylbutazone à 100 mg/kg
- le troisième reçoit une association d'alphachymotrypsine à 50 mg /kg et de phénylbutazone à 100 mg/kg

La légère inhibition obtenue avec l'alphachymotrypsine parait peu significative.

L'action anti-inflammatoire de la phénylbutazone est manifeste. Elle est maximum 3 heures après l'administration du médicament et reste aussi importante 6 heures après.

L'effet de l'association correspond à celui de la phénylbutazone seule.

Nombre d'animaux par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	Pourcentage d'augmentation du volume de la patte en fonction du temps (± δt) 1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
6	150	Témoins	-	-	32 (±10)	66 (±15)	76 (±20)	72 (±18)	70 (±16)	69 (±17)
6	150	Phénylbutazone	100	voie orale	27 (± 5)	46 (± 8)	41 (±13)	37 (±10)	36 (±12)	33 (±13)
6	150	α - C.T.	50		26 (±10)	52 (±15)	57 (±14)	55 (±15)	53 (±14)	49 (±14)
6	150	(Phénylbutazone) α - C.T.	100 50		19 (±10)	35 (±15)	42 (±15)	36 (±16)	36 (±17)	26 (±15)

Tableau VI - Action de l'association alphachymotrypsine - phénylbutazone (administrée par voie orale) vis-à-vis de l'oedème de la patte déclenché par le kaolin.

Les résultats sont représentés graphiquement par la figure 10.

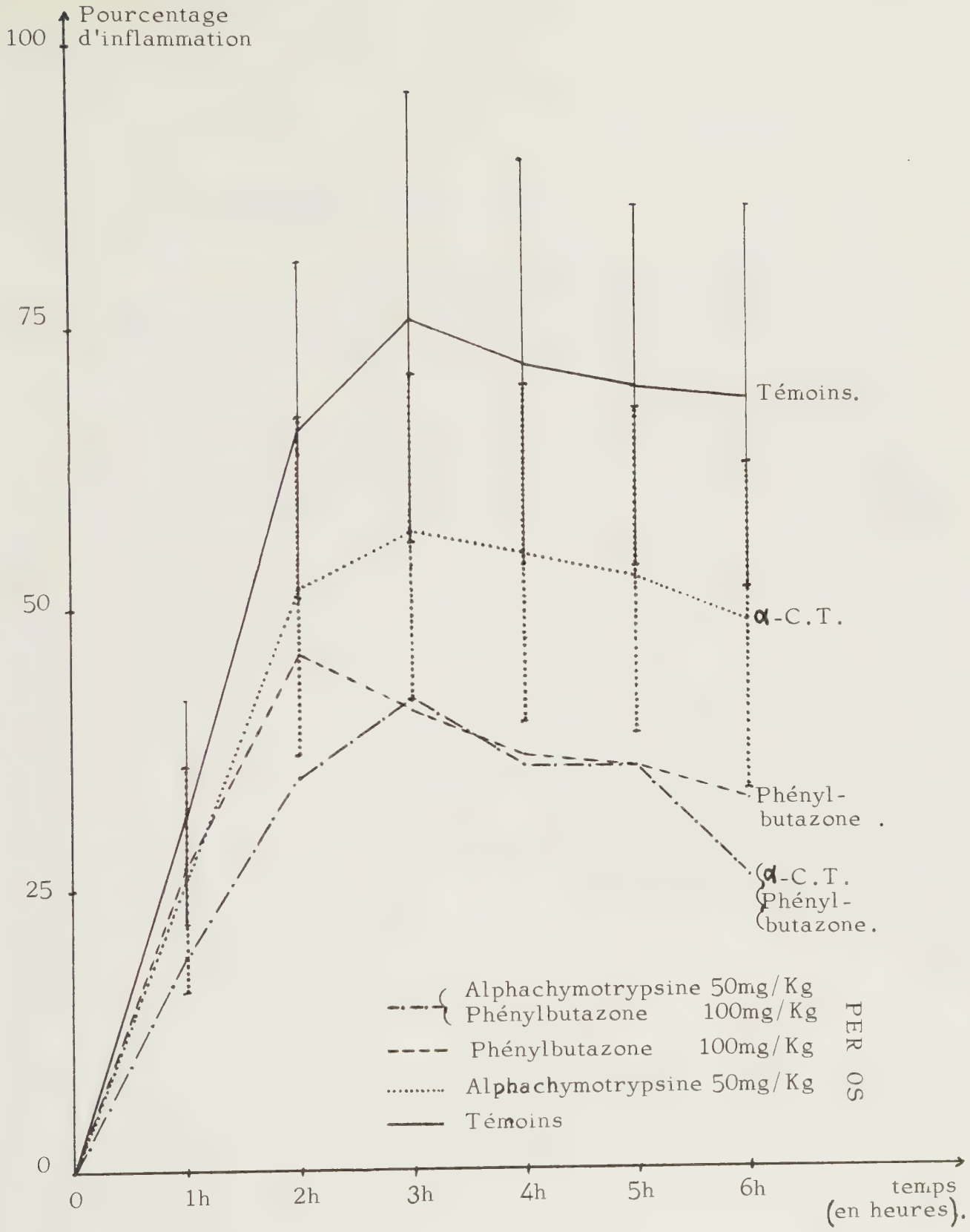


Figure 10 : Oedème localisé au kaolin.(les rats sont traités par voie orale).

Remarque :

Nous avons signalé dans notre première partie que LWOFF J.M. et BOISSIER J.R. (58) utilisaient la trypsine comme agent irritant pour déclencher un oedème localisé de la patte.

L'alphachymotrypsine et la trypsine présentant des parentés manifestes tant au niveau de leur structure que de leur mode d'action, nous avons cherché à savoir si l'alphachymotrypsine pouvait se comporter, elle aussi, comme agent phlogogène.

Nous l'avons donc injectée sous l'aponévrose plantaire à doses croissantes : 10 mg/kg et 50 mg/kg sous un volume de 0,1 ml (suspension dans le soluté isotonique de chlorure de sodium).

Nous avons alors observé un très net effet inflammatoire dont les chiffres ci-dessous donnent une idée :

- à 10 mg/kg : le maximum est atteint en 3 h et son intensité est de 150 p.100
- à 50 mg/kg : l'acmé est atteintedès la première heure et se situe à 150 p.100

B)-OEDEME GENERALISE.

Principe

Chez le rat, l'injection intra-péritonéale d'ovalbumine (ou blanc d'oeuf) ou de dextran provoque , par un phénomène d'histaminolibération, une réaction oedémateuse généralisée. Cette réaction inflammatoire hyperergique de nature vasculo-conjonctive se manifeste électivement au niveau des extrêmités.

D'après HALPERN B.N. (38) une vaso-dilatation intense apparait au niveau des pattes 15 à 40 minutes après l'injection. Puis, très rapidement, un oedème des pattes et du museau se développe et atteint son maximum 90 à 100 minutes après l'injection. La tuméfaction des pattes est alors extrême, les lèvres et la langue sont oedématiées et souvent cyanosées, le nez saillant, tuméfié et rouge.

L'appréciation quantitative de ces phénomènes inflammatoires est réalisée en conjuguant l'observation de l'oedème dont l'intensité est appréciée selon l'importance des territoires touchés, et la mesure du volume de la patte postérieure gauche par pléthysmographie (ceci afin d'introduire un élément moins subjectif dans l'étude de cette réaction).

Technique opératoire

Des rats mâles, de souche Wistar, d'un poids de 140 à 200 g , sont répartis en lots homogènes.

Ils reçoivent dans la cavité péritonéale :

- soit 1 ml d'ovalbumine (provenant d'un mélangede blancs d'oeufs frais)
- soit 1 ml de dextran à 6 p.100 (CLIN - COMAR - BYLA).

L'intensité de l'oedème généralisé est apprécié conformément aux critères suivants :

0 : absence d'oedème
+ : léger oedème des pattes
++ : oedème des pattes plus marqué
+++ : oedème des pattes, du museau et de la langue
++++ : oedème généralisé intense

De plus, on mesure le volume de la patte postérieure gauche à l'aide du pléthysmographe UGO-BASILE selon les modalités déjà décrites.

Produits administrés

Nous avons étudié l'action de l'association alpha-chymotrypsine-chlorphéniramine en traitant les animaux 30 minutes avant l'injection de l'agent inflammatoire.

Dans un essai préliminaire, nous avons noté que la chlorphéniramine, en solution dans un mélange à parties égales d'eau et de sirop simple, administrée par tubage gastrique, présentait durant 2 heures environ une activité anti-oedèmateuse liminaire à la dose de 3 mg/kg.

L'administration de l'association a été pratiquée selon deux modalités :

- soit par voie orale. Les animaux reçoivent simultanément la chlorphéniramine à la dose de 3 mg/kg et l'alphachymotrypsine (en suspension dans un mélange à parties égales d'eau et de sirop simple) à la dose de 50 mg/kg.

- soit par voie orale pour la chlorphéniramine à la dose de 3 mg/kg et en même temps, par voie sous-cutanée (au niveau du dos) pour l'alphachymotrypsine (prise en suspension dans le soluté isotonique de chlorure de sodium) à la dose de 20 mg/kg.

Calculs

L'intensité moyenne de l'oedème est appréciée :

- d'une part, en divisant la somme des croix individuelles par le nombre de rats utilisés : il s'agit d'une appréciation grossière et toute subjective qui ne tolère pas le contrôle du calcul statistique,

- d'autre part, en calculant les pourcentages d'augmentation du volume de la patte postérieure suivant le protocole décrit au paragraphe précédent.

Résultats

1°) Oedème généralisé au dextran (Tableau VII).

Si les pourcentages et l'intensité de l'inflammation nous renseignent sur l'action des substances étudiées, il est à noter que, dans le cas de cette expérimentation, certains animaux se sont trouvés protégés pendant toute la durée de nos essais, ou seulement pendant les premières heures, tandis que d'autres manifestaient une réaction inflammatoire généralisée plus ou moins intense. Il ne nous a donc pas été possible de calculer les écarts σt pour les animaux traités.

. Avec la chlorphéniramine seule :

1 animal se trouve protégé durant toute notre expérimentation, et 1 autre durant la première heure seulement.

. Avec l'association par voie orale :

1 animal se trouve protégé durant toute la durée de l'essai,

4 autres durant la première heure seulement.

. Avec l'association, lorsque l'alphachymotrypsine est administrée par voie sous-cutanée :

3 animaux se trouvent entièrement protégés.

Nombre de rats par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	Augmentation de l'oedème généralisé en fonction du temps 1 h P.	1 h I.	2 h P.	2 h I.	3 h P.	3 h I.	4 h P.	4 h I.	5 h P.	5 h I.
8	160	Témoins	-	-	69(±3)	1,8+	60(±7)	1,7+	52(±9)	1,6+	44(±3)	1,4+	40(±7)	1,2+
6	140	Chlorphéniramine	3	per os	39	1,2+	47	1,5+	45	1,5+	42	1,3+	31	1 +
8	150	Chlorphéniramine α - C.T.	3 50	per os per os	6	0,3+	52	1,6+	47	1,5+	39	1,2+	38	1,2+
6	140	Chlorphéniramine α - C.T.	3 20	per os S.C.	21	0,9+	30	1 +	31	1 +	26	0,9+	19	0,5+

Tableau VII : Action de l'association alphachymotrypsine-chlorphéniramine vis-à-vis de l'oedème généralisé au dextran.

Légende : P. = pourcentage
I. = intensité

Les résultats sont représentés graphiquement par la figure 11.

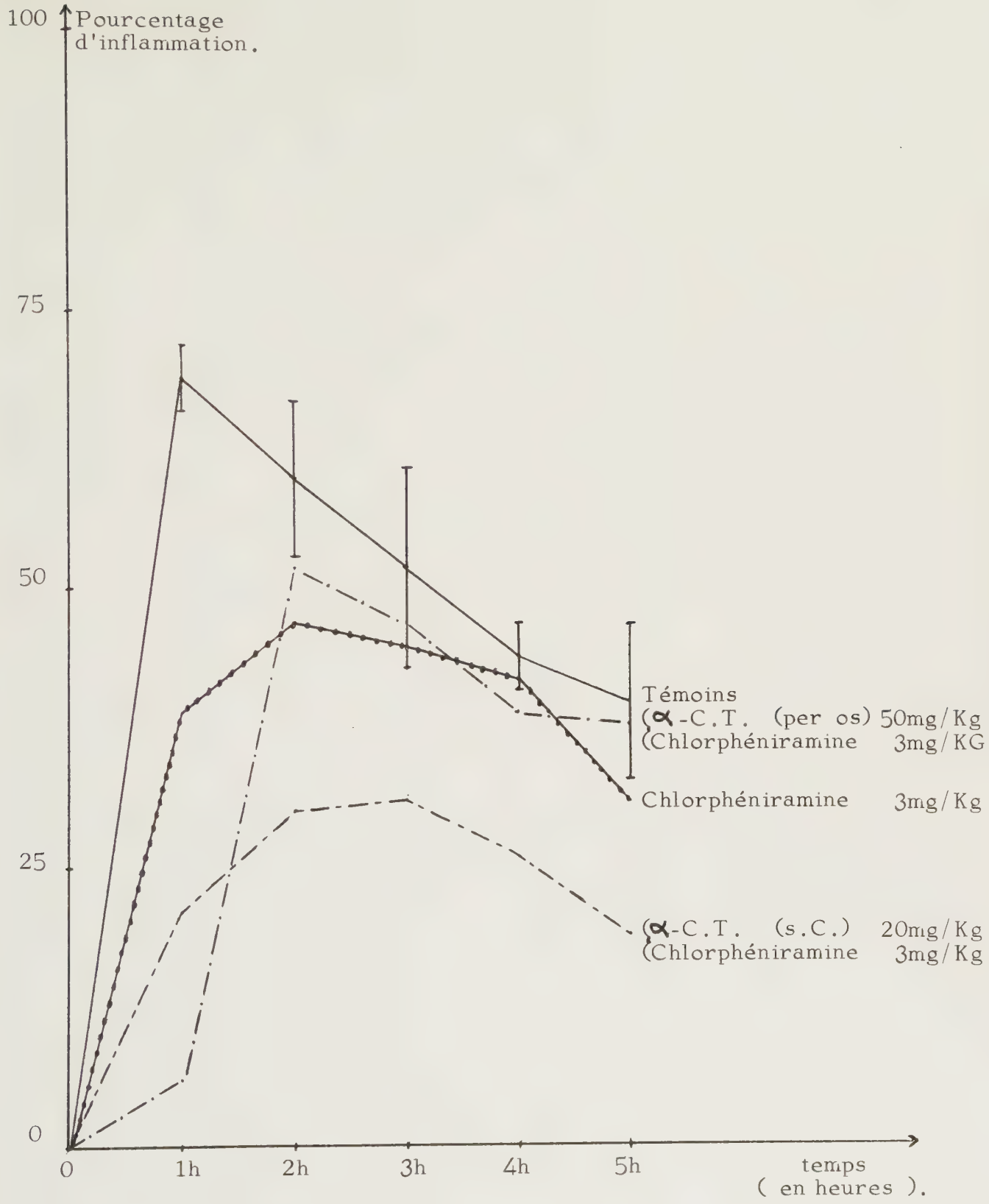


Figure 11 : Oedème généralisé au dextran.

Nombre de rats par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	Augmentation de l'oedème généralisé en fonction du temps 1 h P.	1 h I.	2 h P.	2 h I.	3 h P.	3 h I.	4 h P.	4 h I.
6	120	Témoins	-	-	31 (±21)	1,3+	69 (±16)	1,6+	51 (±12)	1,1+	45 (±12)	1 +
5	120	Chlorphéniramine	3	per os	11	0,3+	47	1,5+	39	1,3+	35	0,8+
6	120	∝ - C.T.	50	per os	36	1,3+	37	1,3+	32	0,6+	27	0,6+
6	120	(Chlorphéniramine 3) ∝ - C.T. 50		per os	40	1 +	34	0,9+	28	0,5+	24	0,5+

Tableau VIII : Action de l'association alphachymotrypsine- chlorphéniramine administrée per os, vis à-vis de l'oedème généralisé à l'ovalbumine.

Légende - P. : Pourcentage
I. : Intensité

Ces résultats sont représentés graphiquement par la figure 12

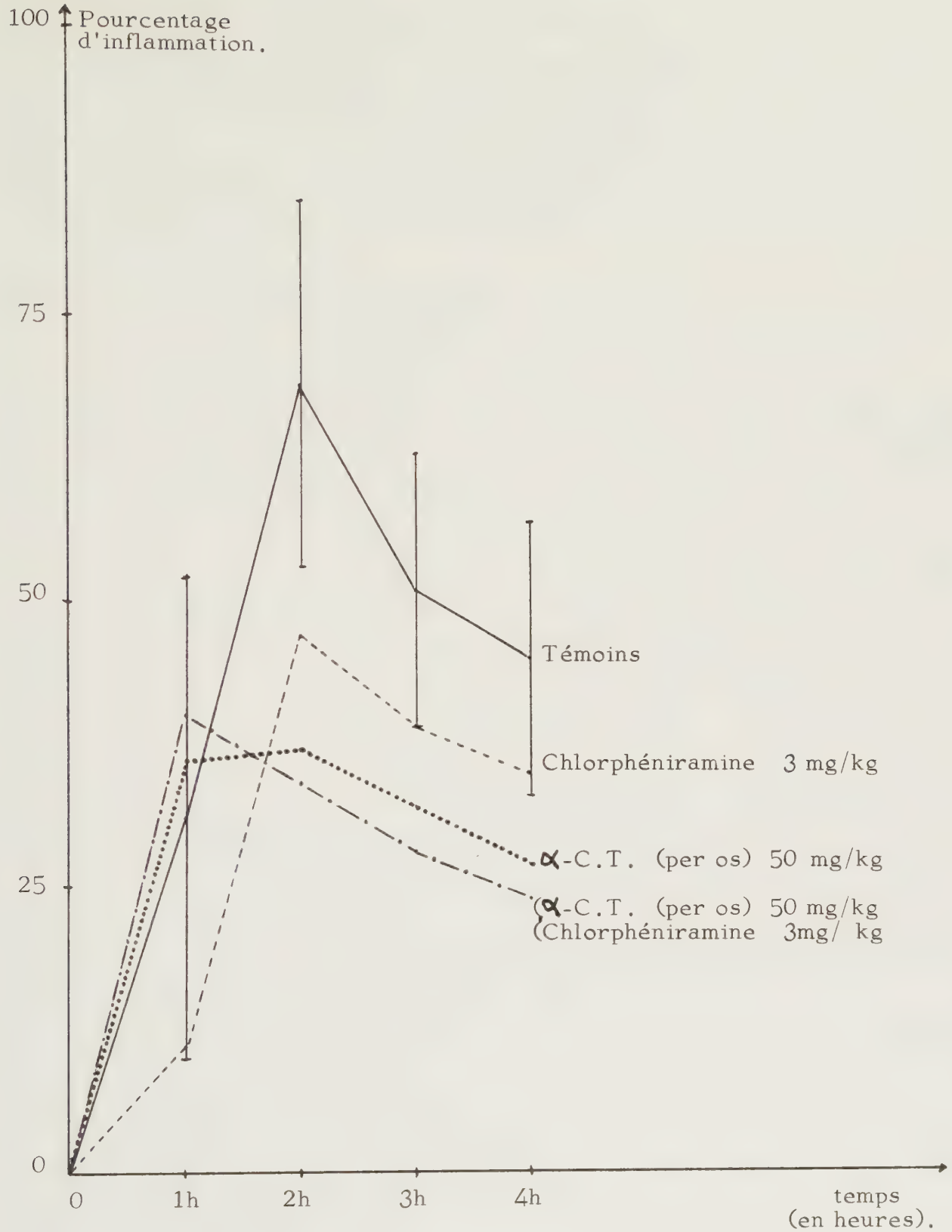


Figure 12: Oedème généralisé à l'ovalbumine.(les rats sont traités par voie orale).

L'association administrée par voie orale parait manifester un effet favorable durant la première heure. Au delà, ses effets correspondent à ceux de la chlorphéniramine seule.

Lorsque l'alphachymotrypsine est administrée par voie sous cutanée, l'association renforce les effets de la chlorphéniramine vis-à-vis de l'inflammation généralisée déclenchée par le dextran.

2°) Oedème généralisé à l'ovalbumine

a) Lorsque l'alphachymotrypsine est administrée per os (Tableau VIII) .

Comme précédemment, il ne nous a pas été possible de calculer les écarts σt pour les animaux traités, car quelques uns se sont trouvés protégés pendant toute la durée de l'essai.

. Avec la chlorphéniramine seule :

1 animal est protégé durant toute notre expérimentation et 3 autres pendant la première heure seulement.

. Avec l'alphachymotrypsine seule à la dose de 50mg/kg

2 animaux sont entièrement protégés

. Avec l'association :

3 animaux sont entièrement protégés.

L'alphachymotrypsine seule, par voie orale, à la dose de 50 mg/kg parait anti-inflammatoire.

Les effets de l'association administrée per os renforcent ceux de la chlorphéniramine.

b) Lorsque l'alphachymotrypsine est administrée par voie sous-cutanée (Tableau IX).

L'alphachymotrypsine seule, à la dose de 20 mg/kg permet une légère réduction de la réponse inflammatoire mais aucun animal n'est complètement protégé.

L'association ici ne renforce pas l'action de la chlorphéniramine : son effet correspond à celui de la chlorphéniramine seule.

Nombre de rats par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	Augmentation de l'oedème généralisé en fonction du temps 1 h P.	1 h I.	2 h P.	2 h I.	3 h P.	3 h I.	4 h P.	4 h I.
6	120	Témoins	-	-	31 (±21)	1,3+	69 (±16)	1,6+	51 (±12)	1,1+	45 (±12)	1 +
6	120	Chlorphéniramine	3	per os	11	0,3+	47	1,5+	39	1,3+	35	0,8+
6	120	∝ - C.T.	20	S.C.	55	1,3+	47	1 +	43	1 +	40	1+
6	120	Chlorphéniramine ∝ - C.T.	3 20	per os S.C.	34	1 +	41	0,8+	36	0,8+	30	0,8+

Tableau IX : Action de l'association alphachymotrypsine (S.C.) -chlorphéniramine (per os) vis-à-vis de l'oedème généralisé à l'ovalbumine

Légende : P. = Pourcentage
I. = Intensité

C)-CONCLUSIONS.

Nous avons rassemblé tous nos résultats dans un tableau récapitulatif afin de mettre en évidence l'action des associations étudiées.

Type d'oedème étudié	Agent inflammatoire	Associations Médicament	Alphachymo - trypsine per os	S.C.
Oedème localisé de la patte	Kaolin	Phénylbutazone	0	
Oe dème généralisé	Dextran	Chlorphéniramine	+ durant la 1ère heure	+
	Ovalbumine	Chlorphéniramine	+	0

Légende : + : l'association est plus active que le médicament seul.
- : l'association est moins active
0 : l'association est aussi active

Tableau X : Comparaison des effets médicament seul et médicament-alphachymotrypsine sur les réactions d'oedème (localisé et généralisé).

. Nous avons testé deux associations par voie orale:

- Avec la phénylbutazone, les effets observés semblent n'être redevables qu'à l'action du dérivé pyrazolé vis-à-vis de l'oedème localisé au kaolin.

- Avec la chlorphéniramine, l'association ne s'est montrée favorable que vis-à-vis de l'oedème généralisé à l'ovalbumine.

. Nous n'avons testé qu'une association mettant en oeuvre des voies d'introduction différentes pour les deux composants:

- la chlorphéniramine administrée par voie buccale et
- l'alphachymotrypsine par voie sous cutanée.

Elle ne s'est montrée favorable que vis-à-vis de l'oedème généralisé au dextran.

Il s'avère difficile dans nos conditions expérimentales de tirer une conclusion ramenant le problème étudié à quelques données simples.

En fait, l'activité des associations anti-inflammatoires étudiées se trouve liée, d'une part, aux agents phlogogènes utilisés , et d'autre part, aux voies d'introduction de l'enzyme.

CHAPITRE III

ROLE DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE DANS UNE ASSOCIATION ANTI-ALLERGIQUE et ANTI-DYSPNEIQUE.

Après avoir envisagé l'action de l'association chlorphéniramine-alphachymotrypsine vis à vis de l'inflammation, nous avons étudié ses effets vis-à-vis du choc anaphylactique consécutif à une libération massive d'histamine endogène, puis vis-à-vis du bronchospasme déclenché par l'inhalation d'un aérosol d'histamine (exogène).

A) CHOC ANAPHYLACTIQUE

Principe

Les animaux sont sensibilisés par 2 injections intra-péritonéales de sérum hétérologue. Deux à trois semaines plus tard, ils reçoivent une nouvelle injection par voie veineuse . Celle-ci déclenche un choc anaphylactique qui aboutit à la mort.

Technique opératoire

Des cobayes mâles tricolores, de 300 à 400 g, fournis par un élevage campagnard sont répartis en 6 lots homogènes. En vue de leur sensibilisation, ils reçoivent à 3 jours d'intervalle, 2 injections intra-péritonéales de 0,5 ml de sérum de mouton.

Quinze à vingt jours après la dernière injection, les animaux privés de nourriture 3 heures avant le début de l'expérimentation (afin de faciliter l'administration orale des médicaments) sont très légèrement anesthésiés à l'éther pour faciliter l'administration intra-veineuse. Ils reçoivent alors par la veine saphène externe l'injection déclenchante constituée par 0, 2 ml de sérum de mouton.

Les animaux non protégés meurent dans les minutes qui suivent. Les survivants sont observés durant 48 heures.

Produits administrés

. Un mélange à parties égales d'eau et de sirop simple sert de véhicule aux administrations orales : la chlorphéniramine s'y trouve en solution et l'alphachymotrypsine en suspension.

Les animaux reçoivent l'association 1 heure avant l'injection déclenchante aux doses de :

1 mg/kg pour la chlorphéniramine

50 mg/kg pour l'enzyme

. Nous avons complété cette étude en introduisant une seconde voie d'administration pour la chymotrypsine : la voie sous cutanée (au niveau du dos).

L'enzyme, en suspension dans le soluté isotonique de chlorure de sodium, est alors injectée à la dose de 20 mg/kg.

Expression des résultats

La mortalité en fonction du temps est exprimée en pourcentage par rapport au nombre initial d'animaux dans chaque lot.

Les résultats sont présentés dans le tableau XI.

Conclusions

La chlorphéniramine seule, per os, à la dose de 1 mg/kg protège les animaux mais son action s'atténue avec le temps.

Quand l'alphachymotrypsine associée à la chlorphéniramine est administrée per os ou par voie sous cutanée, l'action protectrice de l'anti-histaminique se trouve renforcée de la même manière dans les deux cas.

Nombre d'animaux par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	Pourcentage de mortalité en fonction du temps 5 minutes	1 h	3 h	24 h	48 h	Pourcentage de survivants au bout de 48 h
6	400	Témoins	-	-	83	100	0	0	0	0
6	480	Chlorphéniramine	1	per os	0	50	67	0	0	33
6	480	α - C.T.	50	per os	67	0	0	0	0	33
7	440	α - C.T.	20	S.C.	57	0	0	0	0	43
6	480	Chlorphéniramine α - C.T.	1 50	per os per os	0	0	0	0	0	100
7	440	Chlorphéniramine α - C.T.	1 20	per os S.C.	0	0	0	0	0	100

Tableau XI : Action de l'association alphachymotrypsine - chlorphéniramine vis-à-vis du choc anaphylactique.

B) BRONCHOSPASME PAR AEROSOL D'HISTAMINE

Principe

Les animaux sont placés dans une enceinte close où l'on fait arriver un aérosol d'histamine grâce à un compresseur. Celui-ci fait passer l'air ambiant dans un vaporisateur qui contient une solution d'histamine et se trouve relié à la chambre d'essais. (38 - HALPERN B.N.).

Dans nos conditions expérimentales, les animaux témoins soumis à l'action de l'aérosol présentent en moins de 3 minutes un bronchospasme caractérisé par un état de dyspnée allant jusqu'au coma asphyxique.

Technique opératoire

Les cobayes mâles, tricolores, de 400 à 500 g, fournis pas un élevage campagnard sont d'abord sélectionnés : seuls sont retenus les animaux qui présentent un bronchospasme en moins de 3 minutes (ils sont retirés de l'enceinte et placés à l'air frais dès qu'ils tombent sur le côté).

Ils sont alors répartis en 8 lots homogènes (lot 1, 2 , ...8) et testés à trois reprises à 48 heures d'intervalle. A partir de ces trois mesures, on détermine le temps moyen d'apparition du bronchospasme (T_1).

Au jour "J", les animaux sont privés de nourriture 3 h avant le début de l'expérimentation pour faciliter l'administration orale des produits étudiés.

Une heure, 3 heures et 6 heures après avoir été traités, ils sont soumis à l'aérosol d'histamine (solution à 4 p.1000 dans de l'eau glycérinée à 10 p.100).

Produits administrés

Nous avons testé l'association anti-histaminique : chlorphéniramine - alphachymotrypsine.

- La chlorphéniramine est administrée par voie orale, en solution dans un mélange à parties égales d'eau et de sirop, à la dose de 0,4 mg/kg, 1 heure avant le premier passage dans l'enceinte.

- Pour l'enzyme, deux voies d'administration ont été retenues :

. la voie orale (lots 1 à 5 inclus)

. la voie sous-cutanée (lots 6 à 8 inclus).

Les cobayes reçoivent simultanément l'anti-histaminique et l'alphachymotrypsine mise en suspension :

. soit dans un mélange à parties égales d'eau et de sirop simple, lors de l'administration orale; les doses sont alors de 10 et 50 mg/kg.

. soit dans le soluté isotonique de chlorure de sodium, quand la voie sous-cutanée est mise en oeuvre ; la dose est alors de 20 mg/kg.

Calculs

Les pourcentages de protection (par rapport au nombre d'animaux dans chaque lot) sont établis en fonction du temps 1 h, 3 h et 6 h après le traitement.

Ils sont calculés pour chaque animal en appliquant la formule de BOISSIER J.R. (17) :

$$\frac{100\ (T_2 - T_1)}{10 - T_1}$$ ou T_2 et T_1 sont exprimés en minutes.

T_1 correspond au temps moyen d'apparition du bronchospasme, déterminé avant de traiter l'animal (Temps témoin).

T_2 correspond au temps d'apparition du bronchospasme 1 h, 3 h, ou 6 h après le traitement.

Lorsque T_2 et T_1 sont exprimés en secondes, cette formule devient :

$$\frac{100\ (T_2 - T_1)}{600 - T_1}$$

A partir des chiffres ainsi obtenus pour chaque animal, on détermine pour chaque lot le pourcentage moyen de protection à 1 h, 3h et 6 heures.

Résultats

a) Lorsque l'alphachymotrypsine est administrée par voie orale (Tableau XII)

Nombre d'animaux par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	Pourcentage de protection en fonction du temps 1 h	3 h	6 h
6	450	Chlorphéniramine	0,4	PER	73	38	20
6	450	α - C.T	10	PER	2	0	0
6	450	Chlorphéniramine + α - C.T.	0,4 + 10	PER	72	51	49
6	450	α - C.T.	50	OS	2	4	0
6	450	Chlorphéniramine + α - C.T	0,4 + 50	OS	70	68	68

Tableau XII - Action de l'association alphachymotrypsine-chlorphéniramine vis-àvis du bronchospasme par aérosol d'histamine.

Ces résultats sont représentés graphiquement par la figure 13.

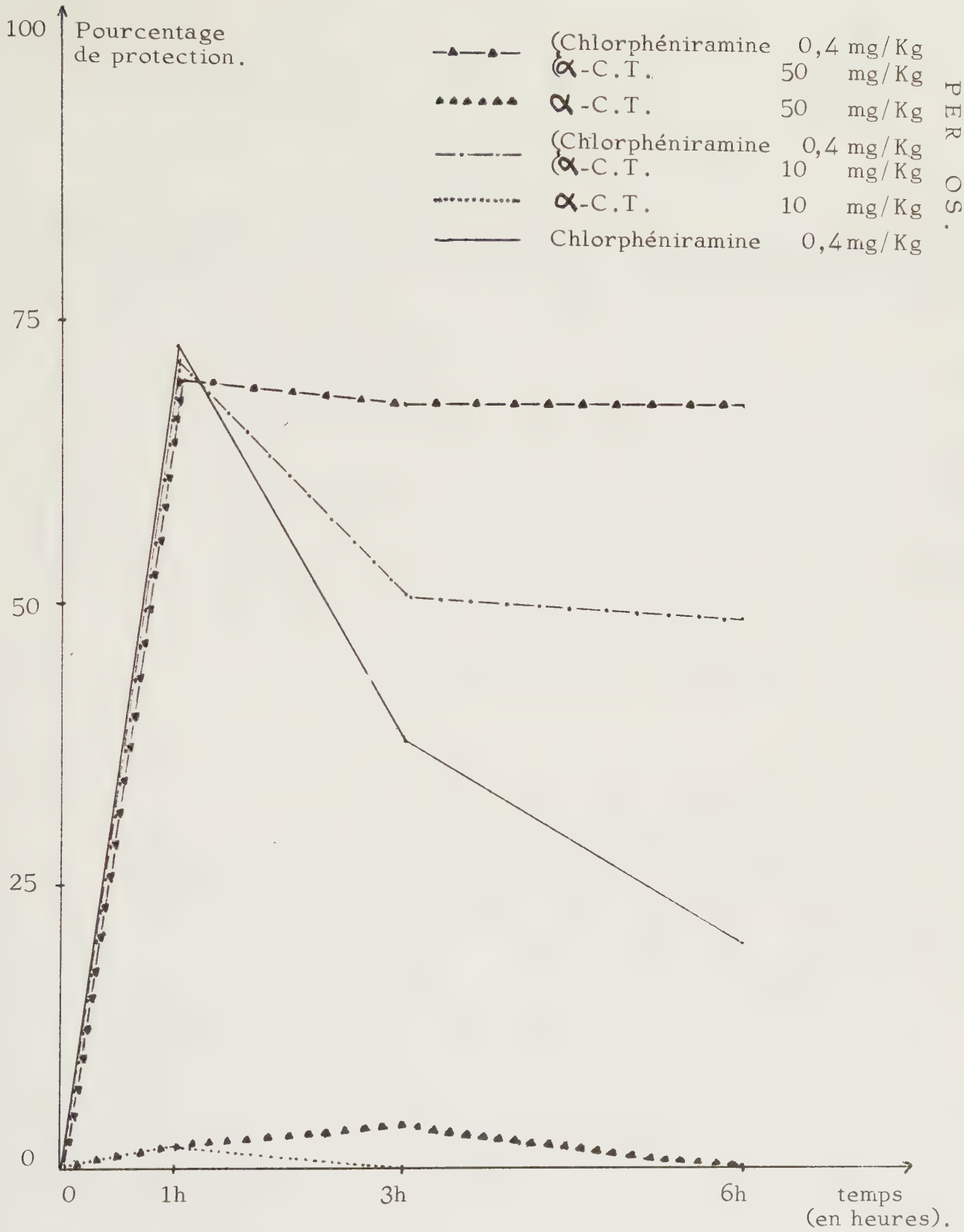


Figure 13 : Bronchospasme par aérosol d'histamine.

b) Lorsque l'alphachymotrypsine est administrée par voie sous-cutanée, les résultats sont moins favorables (Tableau XIII).

Nombre d'animaux par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Nom	Doses mg/Kg	Voie	Pourcentage de protection en fonction du temps 1 h	3 h	6 h
8	470	Chlorphéniramine	0,4	per os	96	43	32
8	500	∝ - C.T.	20	S.C.	6	8	3
8	470	Chlorphéniramine	0,4	per os	89	54	46
		∝ - C.T.	20	S.C.			

Tableau XIII : Action de l'association chlorphéniramine (per os) -alphachymotrypsine (S.C.) vis-à-vis du bronchospasme par aérosol d'histamine

Conclusions

Dans nos conditions expérimentales, l'association chlorphéniramine-alphachymotrypsine administrées per os, favorise la durée de l'action anti-histaminique de la chlorphéniramine, particulièrement à 50 mg/kg en enzyme.

Par contre, lorsque l'alphachymotrypsine est administrée par voie sous-cutanée, l'effet de l'association correspond à celui de la chlorphéniramine seule.

C) CONCLUSIONS

L'activité anti-histaminique de la chlorphéniramine tant vis-à-vis de l'histamine endogène que de l'histamine exogène se trouve renforcée par la présence d'alphachymotrypsine.

Toutefois, cet effet favorable est moins marqué lorsque l'enzyme est administrée par voie sous-cutanée.

CHAPITRE IV

ACTION DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE EN ASSOCIATION AVEC QUELQUES MEDICAMENTS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL.

Différents auteurs ayant montré que l'aphachymotrypsine favorisait la diffusion de certains médicaments à travers la barrière hémo-méningée (83 - SENECA H. et coll. ; 95 - WOHLMAN A. et coll.), nous avons testé quelques associations mettant en oeuvre :

- soit des hypnotiques (penthiobarbital d'une part, et pentobarbital d'autre part)
- soit un tranquillisant (méprobamate).

A) ETUDE DE DEUX ASSOCIATIONS HYPNOTIQUES.

Nous avons fait appel pour ce type d'association à deux barbituriques qui diffèrent par la durée de leur action :

. les effets du penthiobarbital sont ultra-courts.

. ceux du pentobarbital sont courts.

Nous rappelons à ce propos qu'une association commercialisée * contient du Secobarbital dont la durée d'action est courte.

Nous avons étudié l'action hypnotique de ces associations lorsque les barbituriques sont à dose sub-active, afin de pouvoir mettre en évidence, le cas échéant, les effets de ces médicaments.

* Nota : REPOSAL. ®

Principe

Deux critères sont pris en considération pour étudier le sommeil induit chez un animal par un médicament :

- le temps d'endormissement
- et le temps de sommeil.

Le temps d'endormissement (T.E.) est défini par le temps au bout duquel disparait le réflexe de redressement.

Le temps de sommeil (T.S.) est défini par le temps nécessaire pour que ce même réflexe réapparaisse.

Technique opératoire

Ces essais ont été pratiqués sur deux espèces animales : la souris et le rat.

Des souris mâles, de souche Swiss, d'un poids moyen de 23 g, sont réparties en 4 lots homogènes de 6 animaux (lot 1,2,3,4).

Le lot 1 reçoit par voie intra-péritonéale :
. le penthiobarbital à la dose-seuil hypnotique

Le lot 2 reçoit par voie intra-péritonéale :
. l'alphachymotrypsine à la dose de 100 mg/kg
. 30 minutes après : le penthiobarbital administré à dose sub-hypnotique.

Le lot 3 reçoit par voie intra-veineuse :
. le penthiobarbital à dose-seuil hypnotique.

Le lot 4 reçoit :
. par voie sous cutanée, dans la partie haute du dos, l'alphachymotrypsine à la dose de 50 mg/kg.
. 30 minutes après : par voie intra-péritonéale, le penthiobarbital à dose sub-hypnotique.

Nous avons limité nos essais avec cette espèce animale car les souris se montrent particulièrement sensibles aux injections de chymotrypsine : l'administration par voie intra-péritonéale s'avère douloureuse; par voie sous cutanée, elle est source d'intenses prurits qui peuvent aller jusqu'à l'ulcération par grattage.

En outre, dans ce type d'essais, le rat se montre meilleur réactif animal.

Des rats mâles , de souche Wistar, d'un poids moyen de 300 g sont répartis en 8 lots homogènes de 6 animaux (lots 1, 2, ...8) .Les trois premiers sont traités avec le penthiobarbital, les cinq derniers avec le pentobarbital.

Le lot 1 reçoit par voie intra-péritonéale :

. le penthiobarbital à la dose - seuil hypnotique.

Le lot 2 reçoit par voie intra-péritonéale :

. l'alphachymotrypsine à la dose de 100 mg/kg

. 30 minutes après : le penthiobarbital administré à dose sub-hypnotique.

Le lot 3 reçoit :

. par voie sous cutanée (dans la partie haute du dos) l'alphachymotrypsine à la dose de 100 mg/kg

. 30 minutes après : par voie intra-péritonéale, le penthiobarbital à dose sub-hypnotique.

Nos essais avec le pentobarbital nous ont conduit à étudier non seulement l'influence de l'enzyme dans une association où le barbiturique est administré à dose sub-hypnotique, mais encore son rôle lorsque ce dernier est administré à dose-seuil hypnotique, ceci afin d'envisager ses effets éventuels sur le temps d'endormissement et sur la durée du sommeil.

Le lot 4 reçoit par voie intra-péritonéale :

. le pentobarbital à la dose-seuil hypnotique.

Les lots 5 et 6 reçoivent par voie intra-péritonéale :

. l'alphachymotrypsine à la dose de 100 mg/kg

. 30 minutes après : le pentobarbital administré à doses sub-hypnotiques :

- faible pour le lot 5
- un peu plus élevé pour le lot 6.

Le lot 7 reçoit par voie intra-péritonéale :

. l'alphachymotrypsine à la dose de 100 mg/kg

. 30 minutes après : le pentobarbital à la dose-seuil hypnotique.

Le lot 8 reçoit :

. par voie sous-cutanée, l'alphachymotrypsine à la dose de 100 mg/kg

. 30 minutes après : par voie intra-péritonéale, le pentobarbital à la dose-seuil hypnotique.

Produits administrés

Le penthiobarbital et le pentobarbital sont mis en solution dans le soluté isotonique de chlorure de sodium.

La chymotrypsine est mise en suspension dans ce même soluté.

Calculs

A partir des temps d'endormissement et des temps de sommeil établis pour chaque animal, on calcule le temps moyen d'endormissement et la durée moyenne du sommeil pour le lot considéré.

Résultats

Pour les souris

Dans des essais préliminaires, nous avons déterminé les doses-seuil hypnotiques correspondant aux deux voies d'administration du penthiobarbital : intra-péritonéale (lot 1), et intra-veineuse (lot 3).

- Par voie intra-péritonéale , le penthiobarbital à 45 mg/kg a induit en 2 minutes un sommeil qui a duré 1 heure 15.

- Par voie intra-veineuse, à 20 mg/kg, le sommeil a été immédiat mais de très courte durée : 2 minutes.

Nous avons donc choisi 15 mg/kg, comme dose sub-hypnotique, par voie intra-péritonéale et 10 mg/kg , comme dose sub-hypnotique, par voie intra-veineuse.

Les résultats avec l'association penthiobarbital-alpha-chymotrypsine sont présentés dans le tableau XIV

Numéro du lot	Nombre d'animaux par lot	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	T.E.	T.S.
1	6	Penthiobarbital	45	I.P.	2 mn	1 h 15 mn
2	6	(Penthiobarbital) ∝ - C.T.	15 100	I.P.	4 mn	15 mn
3	6	Penthiobarbital	20	I.V.	0	2 mn
4	6	(Penthiobarbital) ∝ - C.T.	10 50	I.V. S.C.	0	30 sec.

Tableau XIV : Action de l'association alphachymotrypsine-penthiobarbital sur des souris.

Pour les rats

a) avec le penthiobarbital

Dans des essais préliminaires, nous avons déterminé la dose-seuil hypnotique correspondant à l'administration de penthiobarbital par voie intra-péritonéale :

- à 40 mg/kg, nous avons obtenu en 2 à 3 minutes un sommeil qui dure 2 heures.

Nous avons donc choisi 20 mg/kg comme dose sub-hypnotique par voie intra-péritonéale.

Les résultats avec l'association penthiobarbital-alphachymotrypsine sont présentés dans le tableau XV.

Numéro du lot	Nombre d'animaux par lot	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	T.E.	T.S.
1	6	Penthiobarbital	40	I.P.	2 mn 30 s	2 h
2	6	(Penthiobarbital) [illegible] - C.T.	20 100	I.P.	3 mn	2 h
3	6	(Penthiobarbital) [illegible] - C.T.	20 100	I.P. S.C.	15 mn	20 mn

Tableau XV : Action de l'association alphachymotrypsine-penthiobarbital sur des rats.

b) avec le pentobarbital

Dans des essais préliminaires, nous avons déterminé la dose-seuil hypnotique correspondant à l'administration de pentobarbital par voie intra-péritonéale :

- à 20 mg/kg, nous avons obtenu en 8 minutes un sommeil qui a duré 1 heure.

Nous avons donc retenu, pour la voie intra-péritonéale, deux doses sub-hypnotiques : 10 mg/kg et 15 mg/kg.

Les résultats avec l'association pentobarbital-alphachymotrypsine sont présentés dans le tableau XVI.

Numéro du lot	Nombre d'animaux par lot	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	T.E.	T.S.
4	6	Pentobarbital	20	I.P.	8 mn	1 h
5	6	Pentobarbital α - C.T.	10 100	I.P.	0	0
6	6	Pentobarbital α - C.T.	15 100	I.P.	6 mn	1 h
7	6	Pentobarbital α - C.T.	20 100	I.P.	4 mn	1 h30 mn
8	6	Pentobarbital α - C.T.	20 100	I.P. S.C	7 mn	1 h

Tableau XVI : Action de l'association alphachymotrypsine-pentobarbital sur des rats

Conclusions

- Cas des souris

L'association penthiobarbital-alphachymotrypsine, administrée par voie intra-péritonéale, exerce un effet favorable puisqu'à dose sub-hypnotique le barbiturique est capable d'induire le sommeil.

Cet effet se manifeste de la même manière, lorsque les voies d'introduction de ses deux composants sont différentes : intra-veineuse pour le barbiturique, sous-cutanée pour l'enzyme.

- Cas des rats

a) L'association penthiobarbital-alphachymotrypsine permet l'apparition du sommeil à une dose où le penthiobarbital seul se montre inactif.

Quand les deux composants sont administrés par la même voie : intra-péritonéale, l'effet est plus manifeste.

Lorsque les voies sont différentes : intra-péritonéale pour le barbiturique et sous-cutanée pour l'enzyme, l'effet est moins marqué.

b) L'association pentobarbital-alphachymotrypsine administrée par voie intra-péritonéale favorise l'action du barbiturique dans la mesure où la dose sub-hypnotique n'est pas trop faible.

A la dose-seuil, l'administration par voie intra-péritonéale des deux composants exerce un effet favorable que nous ne retrouvons pas lorsque les voies d'introduction sont différentes: barbiturique par voie intra-péritonéale et enzyme par voie sous-cutanée. Dans ce dernier cas, en effet, l'action de l'association correspond à celle du pentobarbital seul.

B) ETUDE D'UNE ASSOCIATION SEDATIVE : TRANQUILLISANT - CHYMOTRYPSINE

Ce type d'association a été étudié en faisant appel à un test classique qui permet d'observer le comportement des animaux en situation libre et d'évaluer leur activité motrice spontanée.

Principe

On introduit les animaux dans une cage à activité "APELAB". Elle est constituée par une enceinte close, rectangulaire (dont les parois sont transparentes afin de faciliter l'observation) traversée par deux faisceaux lumineux qui se croisent à angle droit. Lorsqu'un animal au cours de ses déplacements interrompt un faisceau, la cellule photo-électrique correspondante transmet ce " top" à un compteur qui totalise le nombre de passages devant le faisceau considéré.

Technique opératoire

Les souris mâles, de souche Swiss, d'un poids compris entre 18 et 23 g, sont réparties en 4 lots homogènes de 8 animaux (lot 1, 2, 3,4).

- le lot 1 (témoin) n'est pas traité.
- le lot 2 reçoit l'alphachymotrypsine seule, par voie orale, à la dose de 50 mg/kg
- le lot3 reçoit le méprobamate seul, par voie intra-péritonéale, à la dose de 150 mg/kg
- le lot 4 reçoit simultanément selon les modalités décrites ci-dessus chacun des constituants de l'association.

Les animaux des lots 2 et 4 recevant l'enzyme par tubage gastrique, sont mis à jeun 3 heures avant le début de l'expérimentation.

Les souris restent 5 minutes dans la cage où elles passent 4 par 4 dès qu'elles sont traitées. L'essai est renouvelé au bout de 30 minutes, 1 heure et 2 heures.

Produits administrés

Le méprobamate est mis en solution dans le soluté isotonique de chlorure de sodium; l'alphachymotrypsine est mise en suspension dans un mélange à parties égales d'eau et de sirop simple.

Il ne nous a pas été possible d'administrer l'enzyme par la même voie que le méprobamate, à savoir la voie intra-péritonéale, car nous avons retrouvé ici le phénomène douloureux déjà signalé.

Calculs

L'activité motrice spontanée d'une souris est déterminée par le nombre d'interruptions des faisceaux durant 1 minute.

Résultats : Ils sont présentés dans le tableau suivant .

Nombre d'animaux par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	Activité motrice spontanée en fonction du temps 0	30 mn	60 mn	120 mn
8	20	Témoins	-		4,3	4,2	3,8	2,5
8	18	Méprobamate	150	I.P.	3,1	2,8	3,1	2,2
8	23	∝ - C.T.	50	per os	3,5	3,2	3,3	2,1
8	20	(Méprobamate) ∝ - C.T.	150 50	I.P. per os	2,9	2	2,3	2,4

Tableau XVII : Action de l'association alphachymotrypsine (per os) - méprobamate (I.P.) sur l'activité motrice spontanée chez la souris.

Conclusions.

L'association méprobamate-chymotrypsine favorise l'action sédative du méprobamate.

Au bout de 2 heures néanmoins, l'effet a disparu puisque nous retrouvons l'activité motrice spontanée des souris témoins.

C) CONCLUSIONS.

L'effet hypnotique ou sédatif de médicaments du système nerveux central tels que le penthiobarbital et le pentobarbital d'une part, et le méprobamate d'autre part, se trouve favorisé par la présence d'alphachymotrypsine.

Toutefois, cet effet tend à disparaître lorsque l'enzyme est administrée par voie sous-cutanée.

CHAPITRE V

ACTION DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE EN ASSOCIATION AVEC DES CHOLERETIQUES.

La présence d'alphachymotrypsine dans les sucs digestifs déversés au niveau du duodénum nous a conduit à envisager une éventuelle action de l'enzyme vis-à-vis des cholérétiques.

Nous avons testé dans cette étude deux types de cholérétiques : le férulate de magnésium et le phényl -hydroxy-pentane.

Principe

Sur un rat anesthésié, on cathétérise le canal cholédoque et on mesure le débit biliaire de quart d'heure en quart d'heure.

Technique opératoire

Nous avons eu recours à la technique classique de la fistule temporaire (technique de KRAYER adaptée par BOUCARD D.M. - 18)

Des rats mâles , de souche Wistar, d'un poids compris entre 300 et 350 g, sont répartis en 10 lots homogènes (lot 1,2 ....10).

Ils sont anesthésiés à l'uréthanne (1 ml/100 g d'une solution à 10 p.100) . La paroi abdominale est incisée parallèlement à la dernière côte. On soulève le foie pour repérer l'anse duodénale et le canal cholédoque.

On isole le canal puis on glisse, dans sa partie haute, un fin cathéter en polyéthylène. La bile s'écoule alors aussitôt. Elle est recueillie dans des corps de seringue gradués en 1/100 ml. Afin que la cholérèse ne soit pas trop pertubée par le choc opératoire, on laisse s'écouler la bile pendant 30 à 45 minutes, puis on mesure son débit toutes les 15 minutes. Les animaux sont maintenus à température constante pendant toute la durée de l'essai.

La cholérèse de base (C_B) est déterminée par la moyenne de trois mesures à 15 minutes d'intervalle.

Produits administrés

Le férulate de magnésium est mis en solution dans le soluté isotonique de chlorure de sodium.

La chymotrypsine est mise en suspension dans ce même soluté.

Le phényl-hydroxy-pentane est administré pur.

Les doses utilisées sont les suivantes :

- alphachymotrypsine : 100 mg/kg
- férulate de magnésium: 50 mg/kg
- phényl-hydroxy-pentane:280 mg/kg

Deux voies d'introduction ont été testées pour chacun des deux cholérétiques et pour leurs associations respectives :

- la voie intra-duodénale, après ligature du pylore (lots 1 à 5 inclus).
- la voie intra-péritonéale, après ligature du pylore (lots 6 à 10 inclus).

Calculs

On calcule de quart d'heure en quart d'heure la variation (en volume) du débit biliaire par rapport à la cholérèse de base.

Ces variations en fonction du temps sont exprimées en pourcentage de la cholérèse initiale.

Ces pourcentages sont calculés pour chaque animal en appliquant la formule suivante :

$$\frac{C_1 - C_B}{C_B} \times 100$$

où C_B correspond à la cholérèse de base (moyenne de trois mesures)

C_1 correspond à la cholérèse durant le premier quart d'heure qui suit cette détermination.

C_2 correspond à la cholérèse durant le deuxième quart d'heure, etc...

A partir des chiffres ainsi obtenus pour chaque animal, on détermine, pour chaque lot, le pourcentage moyen de la cholérèse de quart d'heure en quart d'heure. Ces pourcentages peuvent être affectés du signe - lorsque le débit est inférieur à la cholérèse de base, ou du signe + lorsqu'il est supérieur.

Résultats

Ils sont présentés dans les tableaux suivants :

Tableau XVIII : les associations sont administrées par voie intra-duodénale.

Tableau XIX : les associations sont administrées par voie intra-péritonéale.

Numéro du lot	Nombre d'animaux par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	Cholérèse en fonction du temps exprimée en pourcentage 1/4 h	1/2 h	3/4 h	1 h	1 h1/4	1 h 1/2	1h 3/4	2 h
6	6	350	∝ - C.T.	100	voie intra - duodénale	- 7	-13	-15	-12	-12	- 9	-11	-15
7	5	320	Férulate de magnésium	50		+37	+112	+66	+36	+13	+10	+ 3	0
8	5	320	(Férulate de magnésium /) ∝ - C.T.	50 / 100		+41	+97	+61	+21	+ 9	+ 2	0	0
9	8	310	Phénylhydroxypentane	280		+38	+63	+96	+106	+116	+129	+126	+126
10	6	310	(Phénylhydroxypentane /) ∝ - C.T.	280 / 100		+45	+84	+101	+114	+115	+121	+119	

Tableau XVIII : Action de deux associations cholérétiques : férulate de magnésium-alphachymotrypsine et phénylhydroxypentane - alphachymotrypsine, administrées par voie intra-duodénale

Numéro du lot	Nombre d'animaux par lot	Poids moyen en g	Produits administrés Nom	Doses mg/kg	Voie	Cholérèse en fonction du temps exprimée en pourcentage 1/4 h	1/2 h	3/4 h	1 h	1 h 1/4	1 h 1/2	1 h 3/4	2 h
1	7	330	∝ - C.T.	100	voie intra - péritonéale	-10	-20	-20	-20	-20	-20	-33	-27
2	5	300	Férulate de magnésium	50		+27	+42	+32	+19	+13	+ 6	+ 6	+ 2
3	6	300	Férulate de magnésium ∝ - C.T.	50 100		+17	+35	+25	+16	+ 7	+ 4	+ 1	0
4	9	310	Phénylhydroxypentane	280		+50	+70	+71	+69	+65	+64	+60	+52
5	6	330	Phénylhydroxypentane ∝ - C.T.	280 100		+63	+102	+104	+100	+99	+97	+89	+76

Tableau XIX : Action de deux associations cholérétiques : férulate de magnésium-alphachymotrypsine et phénylhydroxypentane-alphachymotrypsine, administrées par voie intra-péritonéale.

Conclusions

L'alphachymotrypsine seule, à 100 mg/kg, entraîne une très légère inhibition de la cholérèse, quelle que soit sa voie d'administration : intra-duodénale ou intra-péritonéale.

Par voie intra-duodénale :

Les associations férulate de magnésium - alphachymotrypsine d'une part, et phényl-hydroxy-pentane - alpha-chymotrypsine d'autre part, ne modifient guère la cholérèse induite par chacun de ces médicaments.

Par voie intra-péritonéale :

Les effets de chacune des associations correspondent à ceux de chaque cholérétique pris isolément.

Nous remarquerons cependant que si dans les deux cas l'acmé se manifeste en 30 minutes, le retour à la cholérèse de base s'effectue en 30 minutes pour le férulate de magnésium, tandis qu'il est beaucoup plus long pour le phényl-hydroxy-pentane (la différence de solubilité des deux composés n'est sans doute pas étrangère à ce phénomène).

Les écarts observés entre l'association phényl-hydroxy-pentane - alphachymotrypsine, et le phényl-hydroxy-pentane seul ne sont pas significatifs.

CHAPITRE VI

ACTION-IN VITRO- DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE ASSOCIEE A QUELQUES CONTRACTURANTS ET A LEURS ANTAGONISTES.

Dans cette étude sur organes isolés - duodénum de rat et iléon de cobaye - nous avons essayé de mettre en évidence une action éventuelle de l'alphachymotrypsine vis-à-vis d'agents contracturants (comme l'acétylcholine et le chlorure de baryum) auxquels nous l'avons associée.

De même, nous avons testé ses associations avec les antagonistes des agents contracturants précédemment cités, à savoir atropine et papavérine.

Toute cette expérimentation a été pratiquée selon la technique de MAGNUS :

- bain marie à 37° C.
- oxygène (hôpital)
- tension à 2 grammes
- Solution de Tyrode

NaCl	160 g)	prendre 50 ml de cette	
K Cl	4 g)	solution et ajouter :	
$CaCl_2$	4 g)	Glucose	1 g
$MgCl_2$	0,428 g)	$NaHCO_3$	0,50 g
NaH_2PO_4	1 g)	H_2O	q.s.p. 1 L.
H_2O	q.s.p. 1 L.)		

- éprouvette de 5 ml présentant une sortie dans la partie haute pour évacuer les eaux de lavage, et une sortie dans la partie basse pour réajuster le niveau.

L'oxygène traverse une plaque de verre fritté à la base de l'éprouvette.

Ce dispositif * permet d'une part de nombreux lavages de l'organe isolé sans que celui-ci, à aucun moment, ne se trouve en contact avec l'air, d'autre part, une meilleure répartition de l'oxygène qui contribue en même temps à homogénéiser le milieu.

Les concentrations des divers agents testés sont exprimés en g par ml de solution nutritive au contact de l'organe isolé.

A) ACTION SUR LE DUODENUM ISOLE DE RAT

a) Action de l'alphachymotrypsine seule

1°) Lorsqu'elle est administrée directement dans l'éprouvette, on observe pour de faibles concentrations (6.10^{-8} et 6.10^{-7} g/ml) un léger effet contracturant qui tend à s'atténuer, voire à s'inverser puisqu'à concentrations plus fortes (6.10^{-5}g/ml) nous avons noté une disparition des mouvements spontanés.

2°) Sa présence dans une solution de Tyrode (3.10^{-7}, 3.10^{-6}, et 3.10^{-5} g/ml) parait n'avoir aucune conséquence sur l'activité spontanée du duodénum.

* Nota : Ce dispositif nous a été recommandé par J.C.Le DOUAREC Science Union et Cie, Suresnes (France).

b) Action de l'association acétylcholine-alphachymotrypsine

Les doses utilisées sont les suivantes :

- Acétylcholine $x.10^{-8}$ g/ml
- Alphachymotrypsine $x.10^{-6}$ g/ml

1°) L'enzyme est administrée directement dans l'éprouvette selon différentes modalités :

- avant l'acétylcholine

Quel que soit le temps de contact de l'alpha-chymotrypsine avec le duodénum (de 15 secondes à 1 minute 15) les variations des réponses obtenues ne paraissent pas significatives.

On peut donc considérer que l'administration d'alphachymotrypsine est sans effet sur la réponse obtenue avec l'acétylcholine seule.

Les administrations répétées d'alphachymo-trypsine, même à doses croissantes, ne conduisent pas ici à la tachyphylaxie observée par certains auteurs sur l'iléon de cobaye (36 - GILFOIL T.M. et coll.).

- en même temps que l'acétylcholine

La réponse est comparable à celle que nous avions obtenue avec l'acétylcholine seule.

- et lorsque le pic d'acétylcholine est à son acmé:

Dans certains cas, nous avons noté un renforcement de la contraction, en fonction de la dose d'enzyme.

2°) L'enzyme étant présente dans la solution de Tyrode.

Lorsque la solution de Tyrode contient l'alphachymotrypsine à concentration constante (3.10^{-7}, 3.10^{-6}, ou 3.10^{-5} g/ml)au cours d'un même essai, nous avons observé une tendance à la diminution de l'effet contracturant de l'acétylcholine; il y aurait une réduction de la sensibilité du duodénum de l'acétyl-choline.

Nous avons également tenté d'utiliser des solutions de Tyrode contenant l'alphachymotrypsine à des concentrations successivement croissantes.

Les doses utilisées ont été les suivantes :

- acétylcholine de 2.10^{-8} à 6.10^{-8} g/ml
- solution de Tyrode à 3.10^{-7}, 3.10^{-6}, 3.10^{-5}, 3.10^{-4} g/ml, en alphachymotrypsine

La légère inhibition observée à 3.10^{-7} g/ml s'est maintenue lorsque les doses d'alphachymotrypsine présentes dans le Tyrode ont augmenté progressivement.

A 3.10^{-4} g/ml, les mouvements spontanés deviennent très irréguliers, la ligne de base s'élève et les réponses sont nettement diminuées.

L'alphachymotrypsine associée à l'acétylcholine par administration directe dans l'éprouvette ne modifie pas l'effet de l'acétylcholine seule. Par contre, la présence de l'enzyme dans le Tyrode parait entrainer une inhibition des réponses à l'acétylcholine.

L'hypothèse d'un phénomène de tachyphylaxie n'est pas à exclure.

c) Action de l'association atropine-alphachymotrypsine vis-à-vis de l'acétylcholine

Les doses utilisées sont les suivantes :

- Acétylcholine $x.10^{-8}$ g/ml
- Atropine $x.10^{-9}$ g/ml
- Alphachymotrypsine 3.10^{-8} g/ml

1°) l'alphachymotrypsine étant administrée directement dans l'éprouvette.

L'adjonction simultanée d'alphachymotrypsine et d'atropine réduit l'antagonisme atropine-acétylcholine (figure 14) Mais si l'enzyme est administrée soit avant l'atropine, soit entre l'atropine et l'acétylcholine, aucun effet particulier ne se manifeste.

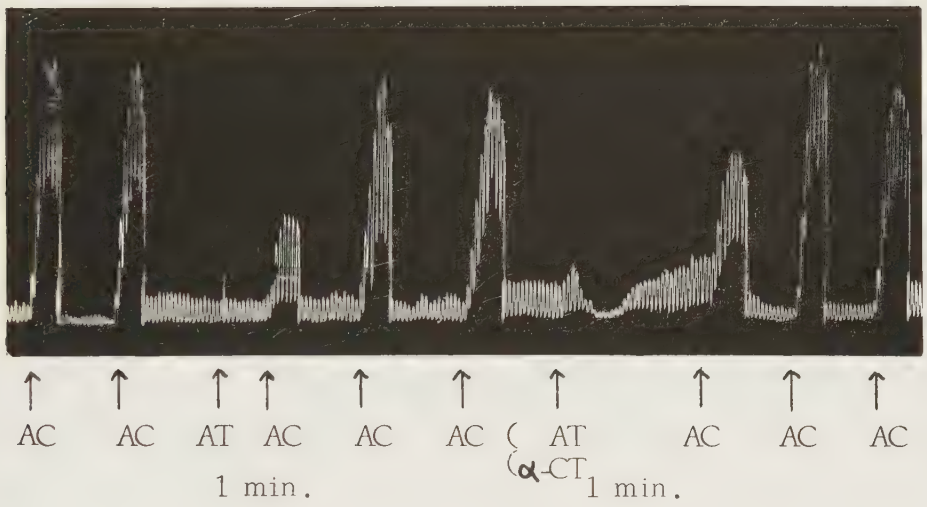


Figure 14 : Duodénum isolé de rat.

AC = acétylcholine 4.10^{-8} g/ml
AT = atropine 4.10^{-9} g/ml
α- CT = alphachymotrypsine 3.10^{-6} g/ml.
min. = minute

2°) L'alphachymotrypsine étant présente dans la solution de Tyrode (3.10^{-6} , 3.10^{-5} g /ml).

Les réponse obtenues sont très irrégulières. Toutefois, nous retrouvons la perte de sensibilité du duodénum à l'acétylcholine précédemment observée.

d) Action de l'association papavérine-alphachymotrypsine vis-à-vis de l'acétylcholine.

Les doses utilisées sont les suivantes :

- Acétylcholine $x.10^{-8}$ g/ml
- Papavérine $2,5.10^{-6}$ g/ml
- Alphachymotrypsine $x.10^{-6}$ g/ml

Quelles que soient les modalités de l'administration de l'alphachymotrypsine dans l'éprouvette, les réponses sont comparables à celles que nous avions obtenues lors de l'étude de cet antagonisme non spécifique.

La présence de l'alphachymotrypsine, dans nos conditions expérimentales, ne modifie en rien l'antagonisme papavérine - acétylcholine.

e) Action de l'association chlorure de baryum-alphachymotrypsine.

1°) l'alphachymotrypsine étant administrée directement dans l'éprouvette.

Les doses utilisées sont les suivantes :

- $BaCl_2$ $x.10^{-5}$ g/ml
- Alphachymotrypsine de 3.10^{-7} à 3.10^{-5} g/ml

- L'alphachymotrypsine étant administrée avant le chlorure de baryum.

Le temps de contact de l'alphachymotrypsine avec le duodénum étant fixé à 20 secondes, les réponses obtenues avec le chlorure de baryum sont soit inchangées, soit légèrement inhibées. Cette inhibition tend à se confirmer lorsque les administrations sont répétées.

- Administration simultanée d'alphachymotrypsine et de chlorure de baryum.

La réponse est comparable à celle que nous avions obtenue avec le chlorure de baryum seul.

2°) L'alphachymotrypsine étant présente dans une solution de Tyrode à la concentration de 3.10^{-6} g/ml

Aucune modification appréciable n'est observée.

f) Action de l'association papavérine-alphachymotrypsine vis-à-vis du chlorure de baryum.

Les doses sont les suivantes :

- $BaCl_2$ 3.10^{-5} g/ml
- Papavérine $x.10^{-5}$ g/ml
- Alphachymotrypsine 3.10^{-6} à 1.10^{-5} g/ml

1°) L'alphachymotrypsine étant administrée directement dans l'éprouvette selon différentes modalités

- Avant la papavérine

Aucune modification n'est notée.

- En même temps que la papavérine

L'adjonction simultanée d'alphachymotrypsine à la concentration de 3.10^{-6} g/ml est sans effet vis-à-vis de cet antagonisme spécifique.

Toutefois l'antagonisme se trouve partiellement réduit lorsque l'enzyme est à 10^{-5} g/ml.

2°) L'alphachymotrypsine étant présente dans une solution de Tyrode à la concentration de 3.10^{-6} g/ml.

Nous avons retrouvé, sans modification appréciable, l'inhibition observée lors de l'étude de cet antagonisme.

B) ACTION SUR L'ILEON ISOLE DE COBAYE

a) Action de l'association acétylcholine-alphachymotrypsine

Les doses utilisées sont les suivantes :

- alphachymotrypsine 3.10^{-6} g/ml
- acétylcholine 4.10^{-9} g/ml

L'administration simultanée de ces deux substances est sans effet sur la réponse obtenue avec l'acétylcholine seule.

b) Action de l'association atropine-alphachymotrypsine vis-à-vis de l'acétylcholine.

Nous avons administré simultanément l'atropine à 5.10^{-10} g/ml et l'alphachymotrypsine à 3.10^{-6} g/ml pour s'opposer aux effets de 4.10^{-9} g/ml d'acétylcholine.

Dans ces conditions, l'antagonisme est plus faible.

C) Le tableau XX récapitule toutes les réponses obtenues au cours de nos essais in vitro, afin d'en mieux dégager les conclusions.

		Alphachymotrypsine introduite dans :		Réponses témoins AC	Réponses témoins AT-AC	Réponses témoins P-AC
DUODENUM ISOLE DE RAT	Alphachymotrypsine seule	-l'éprouvette	contracturant léger			
		-sol. de Tyrode	0			
	Association Acétylcholine-Alphachymotrypsine	-l'éprouvette . avant l'AC . en même temps que AC . quand pic AC à l'acmé		// - contracturant léger		
		- sol. de Tyrode		réduction de la sensibilité à l'AC (inconstante)		
	Association Atropine-Alphachymotrypsine vis-à-vis de l'Acétylcholine	-l'éprouvette . avant AT . en même temps que AT . entre AT et AC			= ↘ =	
		-sol. de Tyrode			réduction de la sensibilité à l'AC	
	Association Papavérine-Alphachymotrypsine vis-à-vis de l'Acétylcholine	-l'éprouvette . en même temps que P . entre P et AC				=
ILEON DE COBAYE	Association Acétylcholine - Alphachymotrypsine	-l'éprouvette . en même temps que AC				
	Association Atropine-Alphachymotrypsine vis-à-vis de l'Acétylcholine	- l'éprouvette . en même temps que AT			↘	

	Alphachymotrypsine introduite dans :	Réponses témoins $BaCl_2$	Réponses témoins P-$BaCl_2$
Association chlorure de baryum-Alphachymotrypsine	-l'éprouvette . avant $BaCl_2$. en même temps que $BaCl_2$	?	
	-sol. de Tyrode		
Association Papavérine-Alphachymotrypsine vis-à-vis du chlorure de baryum	-l'éprouvette . avant P . en même temps que P		= ↘ (à 10^{-5} g/ml en enzyme)
	-sol de Tyrode		=

Légende :

AC	=	Acétylcholine
AT	=	Atropine
P	=	Papavérine
$BaCl_2$	=	Chlorure de baryum
CT	=	Alphachymotrypsine
//	:	très peu différent
-	:	égal
↘	:	réduction des antagonismes.

TABLEAU XX : Récapitulation des réponses obtenues au cours des essais "in vitro".

D) CONCLUSIONS

Sur le duodénum isolé de rat :

- L'alphachymotrypsine seule agit différemment selon son mode d'administration .

Injectée à différentes concentrations ($10.^{-8}$, $10.^{-7}$, $10.^{-6}$, $10.^{-5}$ g/ml) directement dans l'éprouvette, elle a un léger effet contracturant.

Par contre sa présence dans la solution de Tyrode aux mêmes concentrations reste sans effet.

- L'association acétylcholine-alphachymotrypsine n'entraîne pratiquement pas de modification de la réponse à l'acétylcholine, lorsque l'enzyme est introduite directement dans l'éprouvette .

Cependant sa présence dans la solution de Tyrode entraîne une légère inhibition de cette réponse. L'augmentation des concentrations en alphachymotrypsine accuse cette inhibition mais cette action n'est pas constante.

- L'association atropine-alphachymotrypsine réduit l'antagonisme spécifique atropine-acétylcholine.

Il est à noter que l'administration d'enzyme se montre inefficace lorsqu'elle précède ou suit celle d'atropine.

- L'alphachymotrypsine ne modifie en rien l'antagonisme non spécifique papavérine-acétylcholine.

- Avec l'association chlorure de baryum-alphachymotrypsine quel que soit le mode d'administration de l'enzyme, les réponses sont comparables à celles obtenues avec le chlorure de baryum seul.

- Par contre, comme dans le cas de l'association atropine-alphachymotrypsine, l'association papavérine-alphachymotrypsine entraîne une réduction de l'antagonisme spécifique papavérine - chlorure de baryum lorsque l'enzyme est introduit directement dans l'éprouvette. Sa présence dans la solution de Tyrode est sans effet sur cet antagonisme.

- Sur l'iléon isolé de cobaye

Nos précédentes observations se trouvent confirmées par nos essais sur l'iléon isolé de cobaye.

Les réponses obtenues avec l'association acétylcholine - alphachymotrypsine sont comparables à celles obtenues avec l'acétylcholine seule.

Par contre, l'association antropine-alphachymotrypsine entraîne une réduction de l'antagonisme spécifique.

Nous pouvons déduire de toutes ces observations que la présence d'alphachymotrypsine ne modifie guère les effets des agents agonistes auxquels elle est associée.

Par contre, associée à des substances du type atropine ou papavérine elle réduit l'antagonisme spécifique induit par chacune d'elle.

E) DISCUSSION.

Comment expliquer les réponses observées ?

Trois mécanismes pourraient intervenir selon le niveau d'action de l'alphachymotrypsine :

- par action sur l'agoniste.

Elle semble devoir être éliminée du fait de la nature non protéïque des agents agonistes.

- par action directe sur l'antagoniste :

sur l'atropine

sur la papavérine

elle parait improbable étant donné leur nature non protéïque, mais l'éventualité d'une liaison protéïne-médicament n'est pas à rejeter.

- par action sur le duodénum lui même :

A titre d'hypothèse, on peut penser qu'à faible dose, in vitro, l'action protéolytique de l'alphachymotrypsine n'est plus freinée par les inhibiteurs qui sont présents dans la paroi intestinale et empêchent ainsi la lyse du duodénum in vivo. Elle s'exercerait alors en favorisant la formation de polypeptides à action contracturante dont l'action n'est pas antagonisée par l'atropine ou la papavérine. La vérification de cette hypothèse justifierait un travail qu'il ne nous a pas été possible d'entreprendre.

A forte dose, par contre (10^{-5} et 10^{-4} g/ml) l'action protéolytique de l'alphachymotrypsine est telle que le fragment de duodénum n'est plus apte à se contracter et on assiste alors à son relâchement.

De plus, il est très vraisemblable que certaines réactions soient imputables au degré de pureté des échantillons testés.

	Association de l'Alphachymotrypsine avec	Essais pratiqués	Voie d'administration de l'alphachymotrypsine	Effets de l'association par rapport au médicament seul
IN VIVO	Anti-inflammatoires			
	- Phénylbutazone	Oedème localisé (Kaolin)	orale	0
	- Chlorphéniramine	Oedème généralisé		
		. Dextran	orale	+
			sous-cutanée	+
		. Ovalbumine	orale	+
			sous-cutanée	0
	Anti-histaminique			
	- Chlorphéniramine	choc anaphylactique	orale	+++
			sous-cutanée	+++
		bronchospasme par aérosol d'histamine	orale	++
			sous-cutanée	0
	Médicaments du système nerveux central			
	- Barbituriques			
	. Penthiobarbital	étude du sommeil (T.E. et T.S.)	intra-péritonéale	++
			sous-cutanée	+
	. Pentobarbital		intra-péritonéale	++
			sous-cutanée	0
	- Tranquillisant :			
	. Méprobamate	activité motrice spontanée	orale	++
	Cholérétiques			
	- Férulate de magnésium	Fistule biliaire temporaire	intra-péritonéale	0
	- Phényl-hydroxy-pentane		intra-duodénale	0
IN VITRO	Acétylcholine	Duodénum isolé		0
	- Atropine (vis-à-vis de l'acétylcholine)			+
	- Papavérine (vis-à-vis de l'acétylcholine)			0
	$BaCl_2$			0
	- Papavérine (vis-à-vis du $BaCl_2$)			+
	Acétylcholine	Iléon isolé		0
	- Atropine (vis-à-vis de l'acétylcholine)			+

Tableau XXI - Récapitulatif de nos travaux personnels.

Légende : 0 = l'association est aussi active que le médicament seul.
+ = l'association est plus active que le médicament seul.

CONCLUSIONS GENERALES.

L'usage thérapeutique de l'alphachymotrypsine remonte au siècle dernier.

D'abord limité à la gastro-entérologie, son champ d'applications n'a cessé de s'élargir depuis plus de 20 ans grâce aux progrès de l'enzymologie et de la biologie moléculaire.

Malgré un très réel approfondissement des connaissances concernant cette enzyme, sa structure et son mode d'action ne sont pas encore complètement élucidés.

Ses propriétés pharmacologiques ont été mises à profit par les cliniciens qui la prescrivent dans un grand nombre d'affections et tout particulièrement dans les syndrômes inflammatoires et dans le "nettoyage" enzymatique des plaies.

Outre ses propriétés pharmacologiques, son action diffusante a été mise à profit dans diverses associations médicamenteuses.

Au cours de ce travail, l'utilisation de granules glutinisés assurant la protection de l'alphachymotrypsine lors de son passage dans l'estomac ne nous a pas été possible.

Néanmoins, en dépit de son absence dans le sérum 30 minutes après le traitement, la voie orale a été retenue pour l'administration de l'enzyme car, nous avons pu, dans nos conditions expérimentales, vérifier avec quelques associations, l'efficacité de ce mode d'introduction.

1) Lorsque les deux composants sont introduits par la même voie,

Se sont montrées favorables, en administration orale :

- l'association chlorphéniramine-alphachymotrypsine vis-à-vis de l'oedème généralisé au dextran, du choc anaphylactique et du bronchospasme déclenché par un aérosol d'histamine.

- l'association méprobamate-alphachymotrypsine vis-à-vis de l'activité spontanée chez la souris.

N'ont pas modifié les effets du médicament étudié

- l'association avec la phénylbutazone qui, dans nos conditions expérimentales (per os) n'a pas augmenté de façon significative l'activité du dérivé pyrazolé.

- la présence d'alphachymotrypsine dans les associations chlorétiques que nous avons testées (férulate de magnésium ou phénylhydroxypentane) en les administrant, soit par voie intra-duodénale, soit par voie intra-péritonéale n'a pas modifié les effets de chacun de ces deux médicaments pris isolément.

2) Lorsque les voies d'introduction sont différentes pour chacun des deux composants :

a { . voie orale pour le médicament
  { . voie sous cutanée pour l'enzyme

- l'association avec la chlorphéniramine s'est montrée favorable vis-à-vis de l'oedème généralisé au dextran et vis-à-vis du choc anaphylactique mais nous n'avons observé aucun renforcement de l'activité anti-histaminique dans les réactions d'oedème généralisé à l'ovalbumine, ni au cours du bronchospasme par aérosol d'histamine.

b { . voie intra-péritonéale pour le médicament
  { . voie sous-cutanée pour l'enzyme.

- les associations avec le penthiobarbital d'une part, et le pentobarbital d'autre part, ont favorisé l'action propre de ces deux barbituriques.

Ces trois dernières associations mettent en évidence le rôle de l'alphachymotrypsine administrée par voie sous cutanée.

Si l'enzyme est susceptible de renforcer ainsi l'effet de médicaments auxquels elle est associée, il n'est pas inutile toutefois de rappeler que son administration par voie parentérale a donné lieu à des accidents pouvant prendre un caractère gravissime.

De quelle manière l'alphachymotrypsine exerce-t-elle son action ? S'agit-il :

. d'une augmentation de l'absorption intestinale (cas de l'administration per os)
. d'une augmentation de la diffusion
. d'une action pharmacologique propre, complémentaire de celle du médicament associé.

Les résultats que nous venons de rappeler permettent de penser que cette enzyme agirait au niveau de l'absorption et de la diffusion des médicaments.

Cette étude souligne que l'alphachymotrypsine ne favorise pas nécessairement l'activité pharmacodynamique d'un médicament donné.

En conséquence, on ne peut envisager de recourir à une nouvelle association qu'après une étude pharmacodynamique précise et approfondie dont l'interprétation restera toujours délicate.

§ §

§

BIBLIOGRAPHIE.

1 - AMBRUS J.L., LASSMAN B.A., MARCHI J.J.
- Absorption of exogenous and endogenous proteolytic enzymes.
- Clin. Pharm. Ther., 1967, 8, 362-8.

2 - AVAKIAN S.
- Further studies on the absorption of chymotrypsin.
- Clin. Pharm. Ther., 1964, 5, 712-5

3 - AVAKIAN S., KABACOFF B.L.
- Enhancement of blood antibiotic levels through the combined oral administration of phenethicillin and chymotrypsin.
- Clin. Pharm. Ther., 1964, 5, 716-20.

4 - AZCARATE RANGEL C.
- Enzymes anti-inflammatoires et acétaminophène en chirurgie O.R.L.
- Medecina Mex., 1970, 50, 253-7.

5 - BALLS A.K., JENSEN E.F.
- Stoéchiometric inhibition of chymotrypsin.
- Adv. Enzymol., 1952, 13, 321-44.

6 - BAR D.
- Les enzymes utilisées comme médicaments.
- Bull. Soc. Pharm. Lille, 1970, 135-70.

7 - De BARBIERI A.
- Significato ed attivita biologiche degli enzimi proteolitici. Symposium Trypsine et Chymotrypsine, Milan, 18 - 19 Avril 1959.
- Atti della Socièta Lombarde di Science médicobiologiche, 1959, 14 (Suppl.).

8 - De BARBIERI A.
- Activité anti-inflammatoire des enzymes protéolytiques.
- VIè Congrès international de Thérapeutique, Strasbourg, Oct. 1959.

9 - BARRAQUER J.
- Enzymatic zonulysis
- Tr. Am. Acad. Ophth., 1957, 64, 803-6.

10 - BASTIDE P., BASTIDE J.
- Aperçu sur les anti-inflammatoires non stéroïdiques.
- Pharm. Hospital, 1969, 10, 135-46.

11 - BECHET J.J.
- Etude cinétique et thermodynamique de l'hydrolyse du p. toluène- sulfonyl- arginine- méthyl - ester (TSAME) par la trypsine
- J. Chim. Phys., 1964, 584.

12 - BERNARD C.
- Mémoire sur le pancréas.
- Paris. BAILLERE, 1856.

13 - BIETH J.
- Activité et inhibition de la trypsine et de la chymotrypsine: intérêt théorique et applications cliniques.
- Thèse Doctorat Pharm. (Etat), Strasbourg 1967, n° 25.

14 - BLOW D.M., ROSSMANN M.G., JEFFREY B.A.
- The arrangement of alphachymotrypsin molecules in the monoclinic crystal form.
- J. Mol. Biol., 1964, 8, 65-78

15 - BLOW D.M., STEITZ T.A.
- X - Ray diffraction studies of enzymes
- Ann. Rev. Biochem. 1970, 39, 83-87.

16 - BOGNER R.L., SNYDER C.C.
- Chymotrypsine orale à haut dosage comme adjuvant de la chirurgie plastique.
- J. Int. Coll. Surg., 1962, 37, 289-95.

17 - BOISSIER J.R., DUMONT C., GAUTHIER D.
- Effets de la propyromazine (SD 104-19) sur l'appareil respiratoire.
- Thérapie, 1962, XVII, 1233-44.

18 - BOUCARD D.M.
- La fistule biliaire chez l'animal. Etude expérimentale critique.
- Thèse Doctorat Pharm. (Etat), Montpellier, 1957, n° 25.

19 - BRUCE R.A., QUINTON K.C.
- Effect of oral alpha-chymotrypsin on sputum viscosity.
- Brit. M.J., 1962, 1, 282-4.

20 - BRUICE T.C.
- The mecanism for chymotrypsin.
- Proc. Nat. Acad. Sc., 1961, 47, 1924-8.

21 - CHARLES M.
- Nouvelles recherches sur le chymotrypsinogène B. Evaluations quantitatives dans le pancréas du boeuf, et essais d'identification chez le porc.
- Biochim. Biophys. Acta, 1964, 92, 319.

22 - CODEX medicamentarius gallicus, Pharmacopée Française. 1965, 8e édition, p.296.

23 - COLMAN R.W.
- Proteolytic enzymes in clinical medecine.
- Clin. Pharm. Ther., 1965, 6, 599-630.

24 - COURTOIS J.E.
- Le dosage des enzymes utilisées en pharmacie.
- XVIIIè Journées Pharmaceutiques Françaises : "Les enzymes", 1967, 16-9.

25 - DELAUNAY A., BAZIN S.
- Bases expérimentales d'une thérapeutique anti-inflammatoire par la trypsine et la chymotrypsine.
- Rev. Pathol. gén. Physiol. Clin., 1960, 60, 951-70.

26 - DESNUELLE P.
- Chymotrypsin. Trypsin.
- In BOYER P.D., LARDY H., and MYRBÄCK K. editors : "The enzymes", 2 nd ed., vol.4, New York and London, 1960, Academic Press, Inc., 93-132.

27 - DESNUELLE P., FABRE C.
- Sur la séquence N terminale du trypsinogène et son ablation pendant l'activation de ce zymogène.
- Biochim. Biophys. Acta., 1955, 18 , 49.

28 - DINH VAN HOANG, ROVERY M., GUIBONI A., DESNUELLE P.
- Purification and analysis of the B and C chains of alpha-chymotrypsin.
- Biochim. Biophys. Acta., 1963, 69, 188.

29 - DIXON M., WEBB E.C.
- "Les enzymes", 1967, 2nd éd., Ed. Longmans.

30 - DUBE S.K., ROHOLT O.A., PRESSMAN D.
- The required integrity of tyrosine in chymotrypsine for the preservation of the catalytic function.
- J. Biol. Chem., 1964, 239, 1809.

31 - DUHAMEL B., PAGES R.
- Les propriétés anti-inflammatoires des enzymes protéolytiques du pancréas. Application en chirurgie infantile.
- Sem. Hôp. Paris, Octobre 1962, 55, 3161-4.

32 - EDELSTEIN M.M.
- The use of chymotrypsin in plastic surgery.
- California clin., 1960, 56, 81.

33 - ENENKEL A.G., SMELLIE L.B.
- Specificity of chymotrypsin B toward glucagon.
- Biochemistry, 1963, 2, 1449-54.

34 - ERLANGER B.F., COOPER A.G., BENDICH A.J.
- On the heterogeneity of three crystallized alphachymotrypsins.
- Biochemistry(U.S.A.), 1964, 3, 1880.

35 - FULLGABE
- Clinical experience with chymotrypsin.
- Ann. New York Acad. Sc., 1957, 68, 192-5.

36 - GILFOIL T.M., KELLY C.A.
- Mechanism of action of chymotrypsin on plain muscle.
- Brit J. Pharmac. Chemother., 1966, 27, 120-30.

37 - HAKIM A.A., DAILEY J.P., LESH J.B.
- New biochemical achievements in relation to the clinical role of chymotrypsin.
- In "Les enzymes en thérapeutique", VIIè Congrès International de thérapeutique, Genève Octobre 1961, Ed. Mèdecine et Hygiène. Genève , 106-7.

38 - HALPERN B.N.
- Les antihistaminiques de synthèse.
Essais de chimiothérapie des états allergiques.
- Arch. int. Pharmacodyn., 1942, LXVIII, 339-408

39 - HARTLEY B.S.
- Proteolytic enzymes.
- Ann. Rev. Biochem., 1960, 29, 45-72

40 - HARTLEY B.S.
- Amino acid sequence of bovine chymotrypsinogen A.
- Nature, 1964, 201, 1284-7

41 - HARTLEY B.S.
- The structure and activity of chymotrypsin
- in GOODWIN T.W., HARRIS J.I., HARTLEY B.S. editors.
"Structure and activity of enzymes".
Féder. Europ. Biochem. Soc. Sympos., n°1, London 1964.
Academic Press, London and New York, 1964, 47-60.

42 - HEIDENHAIN R.
- Beiträge zur Kenntnis des Pankreas.
- Arch. Ges. Physiol., 1875, 10 , 557.

43 - HILLEBRECHT J.
- Zur routinemähigen Prüfung antiphlogistischer Substanzen im Rattenpfotentest.
- Arzneim . Forsch., 1954, 4, 607-14.

44 - HOFMANN T.
- Similarities in the sequence of trypsin and chymotrypsin.
- in GOODWIN T.W., HARRIS J.I., HARTLEY B.S. editors.
" Structure and activity of enzymes"
Féder. Europ. Biochem. Soc. Sympos., n°1, London 1964
Academis Press, London and New York, 1964, 61-2.

45 - HOWELL I.L.
- Anaphylactic reaction to chymotrypsin.
- J.A.M.A., 1961, 175, 322-4.

46 - INAGAMI T., MITSUDA H.
- The mecanism of the specificity of trypsin catalysis. II : comparison of trypsin and alphachymotrypsin in the non - specific catalysis of the hydrolysis of acetyl - glycine - ethyl - ester.
- J. Biol. Chem., 1964, 239, 1388-94.

47 - INNERFIELD I.W.
- The anti-inflammatory effect of parenterally administered proteases.
- Ann. New York Acad. Sci., 1957, 68, 167.

48 - JANBON M., FLANDRE O., DAMON M., JANBON F.
- Activité anti-inflammatoire de l'alphachymotrypsine. Etude expérimentale.
- In "Les enzymes en thérapeutique".
VIIè Congrès international de thérapeutique , Genève Octobre 1961, Ed. Médecine et Hygiène Genève 104-6.

49 - KABACOFF B.L., WOHLMAN A., UMHEY M., AVAKIAN S.
- Absorption of chymotrypsin from the intestinal tract.
- Nature, 1963, 199, 815-7

50 - KEIL B., ŠORM F.
- On the structure of chymotrypsinogen A.
- in GOODWIN T.W., HARRIS J.I., HARTLEY B.S. editors
"Structure and activity of enzymes"
Féder. Europ. Biochem. Soc. Sympos.,n°1, London 1964, Academic Press., London and New York, 1964,37-46.

51 - KELLER P.J., COHEN E., NEURATH H.
- The proteins of bovine pancreatic juice.
- J. Biol.Chem., 1958, 233, 344-9.

52 - KRAUT J.
- Recent progress in crystal structure analysis
- in GOODWIN T.W., HARRIS J.I., HARTLEY B.S. editors
"Structure and activity of enzymes"
Féder. Europ. Biochem. Soc. Sympos.,n°1, London 1964, Academic Press., London and New York, 1964,75-77.

53 - KUHNE W.
- Ueber die Verdauung des Eiweisstoffes durch den Pancreassaft.
- Virchows Arch. Path. Anat., 1867, 39, 130.

54 - KUNITZ M., NORTHROP J.H.
- Crystalline chymotrypsin and chymotrypsinogen I : Isolation, crystallization and general properties of a new proteolytic enzyme and its precursor.
- J. Gen. Physiol., 1935, 18, 433-58.

55 - LABOUESSE B., CARLSSON K., HANNAH L., OPPENHEIMER H., HESS G.P.
- Characterization of a residue controlling the activity and conformation of chymotrypsin.
- in GOODWIN T.W., HARRIS J.I., HARTLEY B.S. editors
"Structure and activity of enzymes"
Féder. Europ. Biochem. Soc. Sympos.,n°1, London 1964
Academic Press., London and New York, 1964,71-3.

56 - LASKOWSKI M.
- Chymotrypsinogens and chymotrypsins
- in COLOWICK S.P., KAPLAN N.O. editors " Methods in enzymology", volume II, 8-36. Academic Press, New York, 1955.

57 - LIEBOWITZ D., RITTER H.jr.
- Anaphylactic reaction to chymotrypsin.
- J.A.M.A., 1960, 172, 159-60.

58 - LWOFF J.M., BOISSIER J.R.
- Pharmacologie experimentale des anti-inflammatoires.
- Gaz. Méd. France, 1969, 3, 441-8.

59 - MALOW L.
- The use of chymotrypsin in rectal surgery.
- Am. J. Prat., 1962, 13, 249-51.

60 - MARCA G., VERONESE M.
- Influenza della chimotripsina sull'assorbimento intestinale della tetraciclina.
- Boll. Chim. Farm., 1967, 106, 611-6.

61 - MARCY R.
- Les méthodes d'étude pharmacologique des stéroïdes anti-inflammatoires.
- Produits et Problèmes Pharmaceutiques, 1961, 16, 402-24.

62 - MOSS J.N., FRAZIER C.V., MARTIN J.
- Bromelaïns. The pharmacology of the enzymes.
- Arch. Int. Pharmacodyn., 1963, 145, 166-89.

63 - NEUMAN M.
- Les médicaments anti-rhumatismaux.
- Monographies Médicales et Scientifiques, 1967, n°130,4.

64 - NEURATH H.
- Some consideration of the multiple specificity of proteolytic enzymes.
- Ann. NewYork Acad. Sc., 1957, 68, 11-24.

65 - NEURATH H.
- Protein digesting enzymes.
- Sci. Amer., 1964, 212, 68.

66 - OMEZ Y.E.
- Posologie, indications et résultats du traitement par l'alphachymotrypsine en chirurgie.
- Médecine Praticienne, 1966, n° 279, 47-8.

67 - PECHERE J.F., NEURATH H.
- Studies on the autocatalytic activation of trypsinogen.
- J. Biol. Chem., 1957, 229, 389.

68 - PECILE A., TOSI G., FERRARIO G., VERONELLI C.
- The effect of proteolytic enzymes on the absorption of tetracycline.
- II Pharmaco., Ed. Pr., 1967, XXII, 583-9

69 - PERLES R., COURTOIS J.E.
- Les protéases.
- in JAVILLIER M., POLONOVSKI M., FLORKIN M., BOULANGER P., LEMOIGNE M., ROCHE J., WURMSER R.
Traité de Biochimie Générale, Tome II : Les Enzymes 464-70
Masson et Cie éd., 1964.

70 - RIORDAN J.F., WACKER W.E., VALLEE B.L.
- Buried tyrosyl residues and the activity of trypsin.
- Nature, 1965, 208, 1209.

71 - De ROECK - HOLTZAUER Y., PETIT F.
- Revue des substrats pour protéases.
- Prod. Prob. Pharm., 1971, 26, 169-83.

72 - ROSE K.D.
- Anaphylactic reaction to aqueous chymotrypsin injection, development in previously non-sensitive patient.
- J.A.M.A., 1960, 173, 796-7.

73 - ROUBERTOU J., UZAN A., THEVENOT R.
- Influence de l'alphachymotrypsine sur la répartition de la tétracycline tritiée chez le rat.
- Revue Médecine, 1969, n° 101, 633-5.

74 - ROVERY M.
- Les chymotrypsinogènes et trypsinogènes.
- Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 1757-74.

75 - ROVERY M., POILROUX M., YOSHIDA A., DESNUELLE P.
- Sur la dégradation du chymotrypsinogène par la chymotrypsine
- Biochim. Biophys. Acta., 1957, 23, 608.

76 - SALLMAN L. von
- Expérimental studies of some ocular effects of alpha - chymotrypsin.
- Acta ophthal., 1957, 36, 25-32.

77 - SARKAR N., FOSDICK L.S.
- Mode of action of chymotrypsin on pleural inflammation.
- J. Pharmacol. Exp. Therap., 1964, 146, 258-64.

78 - SCALABRINO R.
- Etude expérimentale des effets anti-inflammatoire et anti-infectieux de la trypsine et de la chymotrypsine.
- In "les enzymes en thérapeutique", VIIè Congrès international de thérapeutique, Genève Octobre 1961, Ed. Médecine et Hygiène, Genève, 26-44.

79 - SCHOELLMAN G., SHAW E.
- Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsine.
- Biochemistry, 1963, 2, 252-5.

80 - SENECA H.
- Chymotrypsin - Biological and clinical evaluation.
- Exp. Med. Surg., Supplément 1965, 63-75.

81 - SENECA H., PEER P.
- Effect of chymotrypsin on the absorption of tetracycline from the intestinal tract.
- Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1963, 657-61.

82 - SENECA H., PEER P.
- Augmentation des taux sanguins et urinaires de tétracyline et de la phagocytose par l'association chymotrypsine-tétracycline.
- Amer. Urolog.Association, Pittsburg, Penns.,Mai 1964.

83 - SENECA H., PEER P.
- Augmentation des taux sanguins et cérébraux des médicaments par la chymotrypsine.
- Am. Acad. of Gen. Prac., San Francisco, Calif.,April 1965.

84 - SHAPIRO R., DOHERTY D.G.
- Hydrolysis of a carbon-carbon bond by trypsin.
- Feder. Proc., 1956, 15, 352.

85 - SHERRY, FLETCHER
- Proteolytic enzymes : a therapeutic evaluation.
- Clin. Pharmacol. Therap., 1960,1, 202-22.

86 - SIMONNET H., THEVENOT R., AUCLAIR M.
- Action anti-inflammatoire des enzymes protéolytiques administrés par voie buccale.
- In "Les enzymes en thérapeutique", VIIè Congrès international de thérapeutique, Genève Octobre 1961, Ed.Médecine et Hygiène. Genève, 108-11.

87 - STRUMEYER D.H., WHITE W.N., KOSHLAND D.E.
- Role of serine in chymotrypsin action - conversion of the active serine to dehydroalanine.
- Proc. Nat. Acad. Sc., 1963, 50, 931-5.

88 - THEVENOT R., ROUBERTOU J., UZAN A., LAINE-BOSZORMENYI M., FALLOT P.
- Influence de l'alpha-chymotrypsine sur la distribution de la tétracycline tritiée chez le rat porteur d'un granulome expérimental.
- Thérapie, 1966, XXI, 457-72.

89 - VALDECASAS F.G.
- Etude expérimentale et pharmacologique de la chymotrypsine.
- In "Les enzymes en thérapeutique", VIIè Congrès international de thérapeutique, Genève, Octobre 1961. Ed. Médecine et Hygiène, Genève, 19-29.

90 - VIALAS M.
- Etude des effets de l'alpha-chymotrypsine en chirurgie générale et infantile.
- Gaz. Méd. Fr., 1960, 67, 2767.

91 - WAGALTER H.
- Effect of CHYMORAL on epididymitis.
- J. Urol., 1962, 87, 444-6.

92 - WESTHEIMER F.H.
- Mechanisms related to enzyme catalysis.
- Adv. Enzymol., 1962, 24, 441-82.

93 - WOHLMAN A., KABACOFF B.L., AVAKIAN S.
- Comparative stability of trypsin and chymotrypsin in human intestinal juice.
- Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1962, 109, 26-8.

94 - WOHLMAN A., RAMIREZ R.I., AVAKIAN S.
- Enhancement of drug activity by chymotrypsin : the synergistic anti-inflammatory activity of chymotrypsin and prednisolone.
- Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1969, 47, 301-4.

95 - WOHLMAN A., SYED M., RONCHI M.
- The effect of chymotrypsin on the gastro-intestinal absorption, tissue penetration and pharmacological activity of drugs.
I : penetration of penicillin through the blood-brain and blood-retinal barriers.
- Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1968, 46, 815-8.

§ §

§

TABLE DES MATIERES.

Pages

- INTRODUCTION. 3

- PREMIERE PARTIE.

CHAPITRE I : NOTIONS FONDAMENTALES ET ACQUISITIONS RECENTES CONCERNANT LA BIOCHIMIE DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE (ET DE LA TRYPSINE). 6

I - Formation 6

A) Les chymotrypsinogènes de boeuf et leurs produits d'activation. 8

1°) Structure et activation du chymotrypsinogène A 8
2°) Structure et activation du chymotrypsinogène B 14

B) Le trypsinogène de boeuf et son activation 15

II - Structure et mécanisme d'action. 17

A) Structure de l'alphachymotrypsine 17
B) Structure de la trypsine 20
C) Comparaison 20
D) Mécanisme d'action de l'alphachymotrypsine et de la trypsine 23

CHAPITRE II : PHARMACOLOGIE DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE ET DE SES ASSOCIATIONS MEDICAMENTEUSES. 30

I - Propriétés pharmacologiques de l'alphachymotrypsine 30

1°) Rôle dans la digestion 30
2°) Action fibrinolytique 31
3°) Action anti-inflammatoire 31
4°) Action anti-oedèmateuse 36
5°) Débridement des plaies 37
6°) Cicatrisation 38
7°) Fluidification 38
8°) Action sur les exotoxines bactériennes 38

II - Les voies d'administration 39

1°) Usage local 39
2°) Voies parentérales 39
3°) Voie orale 41

III- Mécanismes possibles des activités décrites. 42

IV- Les indications cliniques. 43

V - Les associations médicamenteuses de l'alphachymotrypsine 45

1°) Pour favoriser la diffusion d'un médicament 45
2°) Pour renforcer une action thérapeutique donnée 48

Pages

- DEUXIEME PARTIE : Travaux personnels. 50

CHAPITRE I : MODALITES EXPERIMENTALES GENERALES. 52

Dosage de l'alphachymotrypsine dans le sérum 53

CHAPITRE II: ACTION ANTI-INFLAMMATOIRE DE L'ALPHA-CHYMOTRYPSINE ET DE SES ASSOCIATIONS. 56

A) Oedème localisé 57
B) Oedème généralisé 64

CHAPITRE III : ROLE DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE DANS UNE ASSOCIATION ANTI-ALLERGIQUE et ANTI-DYSPNEIQUE. 75

A) Choc anaphylactique 75
B) Bronchospasme par aérosol d'histamine 78

CHAPITRE IV : ACTION DE l'ALPHACHYMOTRYPSINE EN ASSOCIATION AVEC QUELQUES MEDICAMENTS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL. 83

A) Etude de deux associations à base de barbiturique : 83
penthiobarbital-alphachymotrypsine
pentobarbital-alphachymotrypsine
B) Etude d'une association sédative : 91
méprobamate-alphachymotrypsine

CHAPITRE V : ACTION DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE EN ASSOCIATION AVEC DES CHOLERETIQUES. 94

CHAPITRE VI : ACTION IN VITRO, DE L'ALPHACHYMOTRYP-SINE ASSOCIEE A QUELQUES AGENTS CONTRACTURANTS ET A LEURS ANTAGONISTES . 101

A) Sur le duodénum isolé de rat. 101

a) Action de l'alphachymotrypsine seule 101
b) Action de l'association acétylcholine-alphachymo-trypsine 102
c) Action de l'association atropine-alphachymotryp-sine vis-à-vis de l'acétylcholine 103
d) Action de l'association papavérine-alphachymo-trypsine vis-à-vis de l'acétylcholine 105
e) Action de l'association chlorure de baryum-alphachymotrypsine 105
f) Action de l'association papavérine-alphachymo-trypsine vis-à-vis du chlorure de baryum 106

Pages

B) Sur l'iléon isolé de cobaye 107

a) Action de l'association acétylcholine-alphachymotrypsine 107

b) Action de l'association atropine-alphachymotrypsine vis-à-vis du chlorure de baryum 107

C) Tableau récapitulatif des essais "in vitro". 108

D) Conclusions. 109

E) Discussion. 111

TABLEAU RECAPITULATIF DE NOS TRAVAUX PERSONNELS 112

- CONCLUSIONS GENERALES. 113

- BIBLIOGRAPHIE. 117

- TABLE DES MATIERES. 127

§ §

§

Association Amicale des Etudiants en Pharmacie
de Lyon